

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Morphologische und autoradiographische
Untersuchungen zur Frage der cocarcinogenen
Wirkung des Phorbolesters A₁ in Kombination mit
Diäthylnitrosamin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Elke-Dagmar Steuber, geb. van der Meulen
aus Königsberg

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Morphologische und autoradiographische
Untersuchungen zur Frage der cocarcinogenen
Wirkung des Phorbolesters A₁ in Kombination mit
Diäthylnitrosamin

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Elke-Dagmar Steuber, geb. van der Meulen
aus Königsberg

Marburg 1973

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin

der Universität Marburg am 20. 2. 1973

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin

Dekan: Professor Dr. H. Gepen

Referent: Professor Dr. W. Schmid

Correferent: Frau Dr. G. Schaude

I N H A L T

Einleitung

Methodik

I. Tiermaterial und Tierhaltung

II. Versuchsanordnung

A: Unbehandelte Kontrollen

B: Behandlung mit dem Wirkstoff A₁

C: Behandlung mit DÄNA

D: Kombination von DÄNA mit Aceton

E: Kombination von DÄNA mit A₁

III. Aufarbeitung des Versuchsmaterials

1. Herstellung von Schnittpräparaten

2. Anfertigung von Autoradiogrammen

IV. Zähl- und meßtechnische Untersuchungsmethoden

1. Mikroskopisches Zählverfahren

2. Mikroskopisches Meßverfahren

Versuchsergebnisse

I. Auswertung der Autoradiogramme

1. Leber

a) Zelldichte

b) Histogramme

α) Parenchym

β) Extraparenchym

2. Haut

II. Histologische Untersuchung der Spontantoten

Diskussion

Zusammenfassung

Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553805_0064

E I N L E I T U N G

BERENBLUM (1941) und MOTTRAM (1944) haben bei der Kombination unterschwelliger Einzeldosen des Carcinogens 9,10-Dimethyl-1,2-benzanthracen mit Crotonöl Tumoren an der Mäusehaut erzeugt.

Nach der Anordnung des "Berenblum-Experimentes" wurden von HECKER (1963) die Wirkstoffe des Crotonöls untersucht und ihre entzündliche, toxische und cocarcinogene Wirkung beschrieben.

A₁ (12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, 12-TPA-13) ist einer der Wirkstoffe des Crotonöls. Es ist ein Diester des polyfunktionellen Grundalkohols "Phorbol" mit einer kurzkettigen (Essigsäure) und einer langkettigen (Myristinsäure) Fettsäure. Phorbol ist ein tetracyclisches Diterpen (HECKER et al., 1966).

Der Wirkstoff A₁ wurde 1964 erstmals von HECKER, BRESCH und von SZCZEPANSKI isoliert, rein dargestellt und 1965 als toxisch, entzündlich und cocarcinogen hochaktive Substanz charakterisiert (HECKER und BRESCH). Neben der cocarcinogenen Wirkung wurde in Abhängigkeit von der Dosierung auch eine schwach carcinogene Qualität gefunden.

Diäthylnitrosamin (DÄNA) ist seit 1960 durch SCHMÄHL, PREUSSMANN und HAMPERL als sicheres Carcinogen bekannt.

Es fand sich eine strenge Abhängigkeit der zur Krebsentstehung nötigen Induktionszeit von der Höhe der aufgenommenen Gesamtdosis (DRUCKREY, SCHMÄHL und SCHILDBACH, 1961; DRUCKREY und STEINHOFF, 1962; DRUCKREY, SCHILDBACH, SCHMÄHL und PREUSSMANN, 1963; SCHMÄHL und THOMAS, 1965).

DÄNA führt bei Mäusen im Langzeitversuch in fast allen Fällen zu malignen Hämangioendotheliomen der Leber (SCHMÄHL, THOMAS und KÖNIG, 1963; THOMAS und SCHMÄHL, 1965; MICHEL, 1968; SCHAUDE, 1972).

Eine Cocarcinogenese wurde nach den bis jetzt vorliegenden Arbeiten von SCHMÄHL, THOMAS und KÖNIG (1963) für Dimethylaminoazobenzol in Kombination mit DÄNA und von SCHMÄHL, THOMAS, SATTLER und SCHELD 1965 für Tetrachlorkohlenstoff in Kombination mit DÄNA gefunden.

Ein weiterer Syncarcinogeneseversuch von SCHMÄHL und THOMAS, 1965, für Dimethylaminostilben in Kombination mit DÄNA führte zu der Feststellung, daß eine "Syncarcinogenese (BAUER) nur dann mit Sicherheit nachweisbar ist, wenn carcinogene Substanzen mit gleicher Organotropie gleichzeitig oder auch nacheinander (SCHMÄHL) einwirken."

In der vorliegenden Arbeit sollte nach der gleichen Anordnung wie bei HECKER und Mitarbeitern untersucht werden, ob eine unterschwellige Dosierung von DÄNA in Kombination mit unterschwelligen Einzeldosen von A_1 die Tumorbildung insbesondere der Haut begünstigt.

Da unter DÄNA-Einwirkung eine vermehrte DNS-Synthese in der Haut und - nach längerfristiger Applikation - auch eine Änderung der Ploidie in der Haut gefunden wurde, war eine so gerichtete Untersuchung im Hinblick auf eine Aktivierung auch von diesem Gesichtspunkt her von Interesse.

M E T H O D I K

I. Tiermaterial und Tierhaltung

Für den vorliegenden Versuch wurden 150 weibliche Albinomäuse des Reinzuchtstammes NMRI des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht in Hannover eingesetzt. Die Tiere waren 4 Wochen alt und hatten nach achttägiger Eingewöhnung ein durchschnittliches Ausgangsgewicht von 25 g. Alle Tiere waren in gutem Allgemeinzustand und frei von ansteckenden Krankheiten.

Da Albinomäuse in besonderem Maße durch Ektromelie gefährdet sind, wurden die Tiere zu Beginn dieses Langzeitversuches schutzgeimpft (intraperitoneal 0,1 ml Mäuselymphe der Staatlichen Lymphanstalt München pro Tier).

Die Tiere waren in einem klimatisierten Kunstlichtstall (Tag-Nacht-Rhythmus 10:14 Stunden) bei einer Raumtemperatur von 23 bis 24° C in Makrolonkäfigen auf Holzspanstreu untergebracht. Sie wurden mit Gsniff-Presslingen der Firma Plange und mit Wasser oder Testsubstanz aus Saugflaschen ad libitum ernährt.

II. Versuchsanordnung

Der Versuch umfaßte 5 Versuchsgruppen:

A: Kontrollen

B: A₁ (12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat, 12-TPA-13)

C: DÄNA (Diäthylnitrosamin)

D: DÄNA+Aceton

E: DÄNA+A₁

Die pro Versuchsgruppe eingesetzte Tierzahl betrug 30 Tiere, die auf 5 Käfige verteilt wurden.

A: Kontrollen

Die Kontrollen erhielten reines Leitungswasser ad libitum.

B: Behandlung mit dem Wirkstoff A₁ (12-TPA-13)

Vor der Behandlung mit A₁ wurden die Haare der Rückenhaut mit einer Enthaarungscreme (Pilca, Firma Olivin) entfernt.

Analog den Versuchen von HECKER und Mitarbeitern wurde eine 0,01 %ige Lösung von A₁ in Aceton angesetzt. Da die Verbindung A₁ sehr hitzeempfindlich ist, erfolgte die Aufbewahrung im Kühlraum bei 5° C. 0,1 ml dieser Lösung wurde auf die enthaarte Haut wöchentlich 2x aufgetropft. Die Behandlung mit A₁ erfolgte für die Dauer von 9 Wochen; es wurden insgesamt 18x 0,1 ml der A₁-Acetonlösung auf die Haut aufgetragen, entsprechend einer Gesamtdosis von 0,18 mg A₁.

C: Behandlung mit DÄNA

Die Applikation von DÄNA erfolgte im Trinkwasser ad libitum, um eine möglichst gleichmäßige Dauerwirkung zu erzielen.

Da die durchschnittliche Flüssigkeitsaufnahme der Kontrolltiere 0,2 ml/g Körpergewicht und Tag beträgt und eine Tagesdosis von 14 mg DÄNA/kg erwünscht war, wurde eine 0,007 %ige DÄNA-Lösung verabreicht.

Aus der täglich abgelesenen Trinkmenge und der täglichen Ermittlung des Körpergewichtes wurde die real aufgenommene Dosis DÄNA in mg/kg und Tag errechnet.

Die Behandlung mit DÄNA erfolgte 8 Wochen lang.

Die Trinklösung wurde täglich frisch aus höher konzentrierter

Stammlösung hergestellt. Reinsubstanz und 14-tägig erneuerte Stammlösung wurden im Kühlraum bei einer Temperatur von 5° C aufbewahrt. Die Haltbarkeit der Substanz wurde durch Siedepunktsbestimmung überprüft.

D: Kombination von DÄNA mit Aceton

Um die Hautveränderungen durch A₁ sicherer beurteilen zu können, wurde eine Versuchsgruppe wie oben 8 Wochen mit DÄNA behandelt. Anschließend wurde auf die enthaarte Haut 2x in der Woche für die Dauer von 9 Wochen reines Aceton appliziert.

E: Kombination von DÄNA mit A₁

Den Tieren wurde in der Trinkflüssigkeit 8 Wochen lang DÄNA verabreicht. Im Anschluß daran wurde die enthaarte Haut 9 Wochen (18x) mit A₁-Acetonlösung behandelt. Die Konzentrationen waren dieselben wie bei der reinen DÄNA- bzw. reinen A₁-Gruppe.

III. Aufarbeitung des Versuchsmaterials

Bei Spontan-toten wurden der Gesamtsitus protokolliert und die mikroskopisch zu untersuchenden Organe (Leber, Magen, Niere, Lunge, Speicheldrüse, Haut) entnommen und fixiert.

1) Herstellung von Schnittpräparaten

Die formalinfixierten Organe wurden in fließendem Wasser gewässert, schrittweise in aufsteigender Äthanolreihe entwässert und über Chloroform in Paraffin eingebettet.

Mit dem Grundschlittenmikrotom der Firma Leitz, Wetzlar, wurden ca. 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt.

Nach Entparaffinierung mittels Xylol wurden die Schnitte nach PAS (periodic-acid-Schiff-reaction nach Mc Manus 1946) gefärbt. Nach dem Spontanfotografieren wurden aus jeder Gruppe von 23 Tieren histologische Präparate angefertigt.

2) Anfertigung von Autoradiogrammen

Für die nachfolgenden Messungen wurden Autoradiogramme angefertigt. Zu diesem Zwecke wurden in der 26. (Aufreten des 1. Lebertumors) und in der 36. Woche je zwei und in der 40. Versuchswoche drei Tiere aus jeder Gruppe getötet und untersucht. Da die DNS-Synthese im Leberparenchym der Maus tagesrhythmischen Schwankungen unterliegt (PILGRIM, ERB und MAURER, 1963; SCHAUDE), wurde für alle zu tötenden Tiere der Zeitpunkt des DNS-Synthese-Maximums gewählt. Es liegt in der Zeit von 4 bis 8 Uhr. Die Tiere erhielten entsprechend der Verfügbarkeitszeit 40 Minuten vor der Tötung um 6 Uhr morgens durch intraperitoneale Injektion je 50 μ Curie ^3H -Thymidin (TRA 120, Thymidine-methyl-T, spezifische Aktivität 3,0 Curie pro mMol, Amersham). Sie wurden durch Scherenschlag dekapitiert und entblutet, Leber und Haut entnommen und in einem Gemisch von 0,5 % Trichloressigsäure und 6 % Formalin unter Zusatz von 0,5 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert.

Die Autoradiogramme wurden mit "Kodak Stripping Plates AR 10" (Format 12 x 16,5 cm, Auflösungsvermögen ca. 1,5 μm) nach folgender Vorschrift angefertigt (ROGERS, 1967):

Kurzes Einstellen der entparaffinierten, in Trichloressigsäure und inaktivem Thymidin gewaschenen Präparate in Chromalaungelatine (Gelatine 5,0 g, Chromalaun 0,5 g, Aqua dest. ad 1000 ml bei 37° C), staubfreies Trocknen.

In der Dunkelkammer bei "Kodak Safe Light" (Filter rot I) zunächst Unterteilung des Plattenfilms in 16 kleine Rechtecke und Einlegen in Aqua dest. zur Lösung des Films von der Platte. Abnehmen der Filmecken mit zwei Pinzetten und Belegen der Objektträger (Belichtungsseite gegen Präparat), Umschlagen des Überstehenden Filmrandes auf die Objektträgerrückseite. Staubfreies Trocknen; Exposition 13 Tage in schwarzen Kunststoffkästen bei absoluter Dunkelheit.

Entwicklung mit "Kodak-Entwickler D 19 b" 2-3 MIN. bei 20° C. Nach Zwischenwasser Fixierung in gebräuchlichem Fixierbad (8 Min.); Wässern, Trocknen und schließlich Kernfärbung mit Hämalaun und Eindecken in Glycerin-Gelatine.

IV. Zähl- und meßtechnische Untersuchungsmethoden

1) Mikroskopisches Zählverfahren

An Autoradiogrammen der Leber wurde die Zelldichte bestimmt. Dazu wurde in 1000 Gesichtsfeldern die Anzahl der ein- und doppelkernigen Parenchymzellen und Extraparenchymzellen (Endothel- und Kupffer'sche Sternzellen) gezählt. In einem zweiten Arbeitsgang wurde die Anzahl der Mitosen und der markierten Kerne in 1000 Gesichtsfeldern registriert.

Die Zählung erfolgte am "Ortholux" der Firma Leitz (Objektiv 1 : 100 Ölimmersion, Okular 10), an das das Registriergerät "Leukodiff MS" der Firma Boscamp angeschlossen war. Die Auszählung eines Gesichtsfeldes erfolgte mäanderartig von oben nach unten, wobei 2 Längslinien einer Strichplatte im Okular als Hilfszeilen zur Vermeidung von Doppelzählungen dienten.

Angeschnittene Kerne der oberen Bildrandhälfte wurden mitgezählt, die der unteren nicht. Gesichtsfelder mit größeren Gefäßen oder Artefakten wurden ausgenommen.

Zur Zählung der markierten, d.h. durch mindestens 10 Silberkörner ausgezeichneten, Parenchym- und Extraparenchymkerne wurde das "Leitz-Ortholux" mit Pol-Opak-Illuminator und Halogenlampe benutzt. Der Interferenzfilter S 547 erzeugt im Dunkelfeld eine Grünreflexion der Silberkörner, die Auffinden und Zuordnung erleichtert.

Markierung einer Zelle bedeutet Einbau des Tritium-Thymidins in die DNS des Zellkernes, "da nur diejenigen Zellen nach Tritium-Thymidin-Applikation markiert werden, die sich während der Verfügbarkeitszeit des Thymidins in ihrer DNS-Synthesephase befinden." (OEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER, 1961). Die Verfügbarkeitszeit für ^3H -Thymidin beträgt 40 Minuten; nach dieser Zeit erfolgt kein weiterer Einbau, da das Tritium-Thymidin wieder ausgeschieden wird.

Aus der Ermittlung der Zelldichte in Parenchym und Extraparenchym und aus der Anzahl der markierten Kerne in 1000 Gesichtsfeldern wurde der ^3H -Index in der Leber errechnet. In der gleichen Weise wurde der Mitoseindex in der Leber bestimmt.

In der Haut wurde nur die Silberkorndichte der markierten Zellkerne gemessen. Auf die Bestimmung der Zellzahl und des ^3H -Indexes wurde verzichtet, da die Haut aus einzelnen Schichten besteht, die außerdem von Haarbälgen durchsetzt werden, so daß - zumal bei der geringen Anzahl der Tiere - bei der sehr unterschiedlichen Hautdicke mit einer zu großen Streubreite der Einzelergebnisse zu rechnen und damit eine unzulängliche Aussagekraft zu befürchten war. Eine weitere Fehlerquelle liegt in

der Schnittführung bei den histologischen Präparaten, wenn sie nicht exakt zur Schnittebene ausgeführt werden.

B) Mikroskopisches Meßverfahren

Die Bestimmung der Silberkorndichte (Zahl der Silberkörner) der markierten Zellkerne in Leber und Haut erfolgte durch Messung der Reflexion an dem Mikroskop-Photometer der Firma Leitz. Das Leitz-"Ortholux"-Mikroskop konnte durch Erweiterung der Beleuchtungseinrichtungen (Pol-Opak-Illuminator, Halogen-

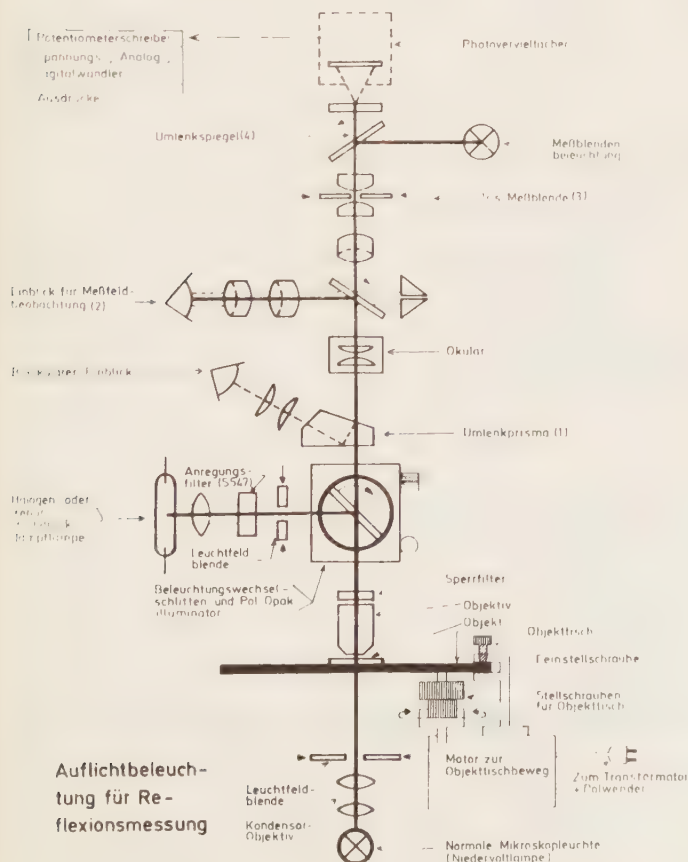


Abb. 1

lampe), Photometeraufsatz mit Photovervielfacher und elektronischer Lichtmeßeinrichtung (Firma Knott, München) zum Mikroskop-photometer "MPV" ausgebaut werden. Als Anregungsfilter zur Grün-reflexion der Silberkörner wurde der Interferenzfilter S 547 (Firma Schott, Mainz) verwendet. Die Meßwerte wurden über einen Spannungs-Analog-Digitalwandler (Firma Hewlett-Packard, USA) ausgedruckt.

Der Meßvorgang am Mikroskopphotometer ist folgender:

Das vom Mikroskop entworfene Objektbild wird nach Einstellung und Fokussierung im Dinokulartubus durch Ausschalten des Umlenkprismas (1) im Einblick (2) des Photometeraufsatzes sichtbar.

Der zu messende Kern wird genau in die Mitte des beleuchteten Meßfeldes eingestellt und der Meßfeldrand mittels der Irisblende (3) an den Kernrand angeglichen. Durch Aufklappen des Umlenkspiegels (4) der Meßblendenbeleuchtung wird der Lichtweg zur Photovervielfacher-Kathode freigegeben; das Meßgerät zeigt jetzt den Meßwert an.

Um die Miterfassung von Nulleffekten auf dem Kern auszuschließen, wurde von diesem Meßwert ein Leerwert abgezogen, der mit gleicher Irisblende im homogenen Feld neben dem markierten Kern ermittelt wurde.

Gemessen wurde mit einer Verstärkung von 1,2 kV. Vor der Messung wurde eine Eichkurve bei an- und absteigender Verstärkung angelegt, wobei mit verschiedenen großen Blenden ein homogenes Feld, ein Parenchym- und ein Extraparenchymkern eingestellt wurden, um sicherzustellen, daß die Messung im linearen Bereich der Kurve erfolgte. (s. Abb. 2)

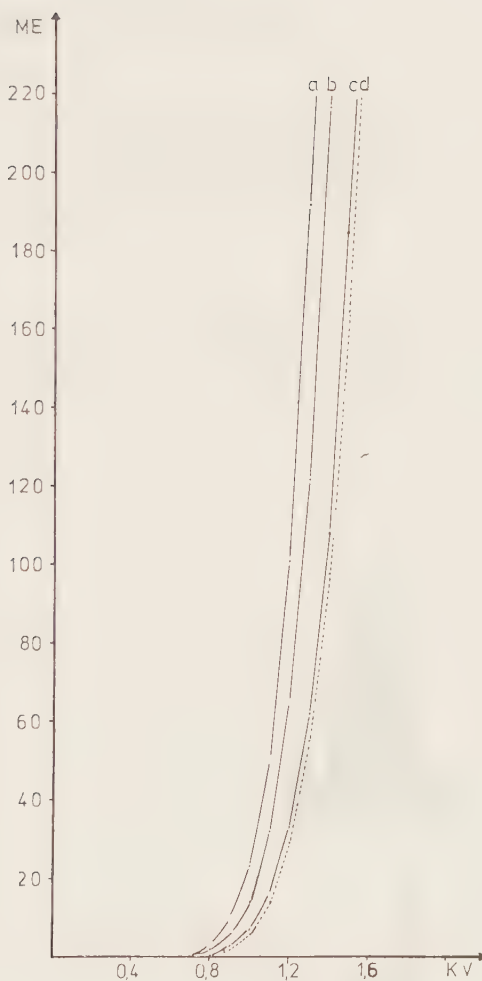


Abb. 2

Eichkurve

- a: homogenes Feld; Blende 300
- b: Parenchymkern; Blende 120
- c: Extraparenchymkern; Blende 100
- d: Extraparenchymkern; Blende 75

Die Größe der Meßblende wurde nach einem besonders großen Parenchymkern gewählt und für alle Messungen - auch die der kleineren Extraparenchymkerne - beibehalten, da die Messung der Silberkorndichte für Parenchym und Extraparenchym in einem Arbeitsgang erfolgte und die Blendeneinstellung dieses Gerätes stufenlos verstellbar ist, so daß sich die eingestellte Blendengröße nicht reproduzieren läßt.

Um zu überprüfen, wieweit diese große Blende bei der Messung kleiner Extraparenchymkerne den Meßwert beeinflusste, wurden markierte Gallengangsepithelien mit kleiner und großer Blende gemessen.

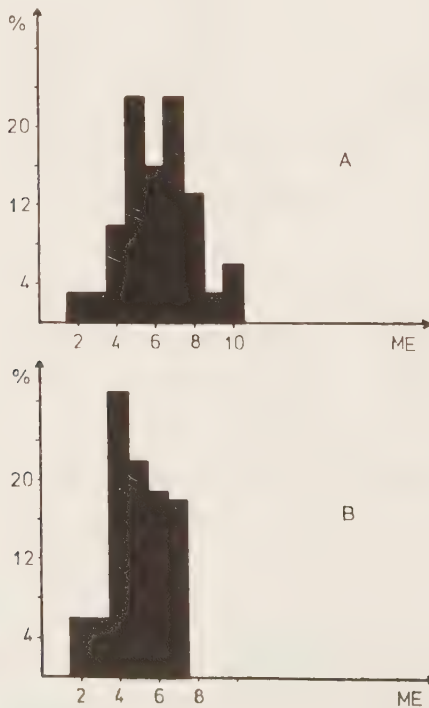


Abb. 3

Gallengangsepithelien mit verschiedener Blende gemessen

A: groß, B: klein

Der eigentliche Meßwert erweist sich als fehlerfrei; allerdings führt die größere Blende zu größerer Streuung, da mehr Streulicht miterfaßt wird.

Nach Beendigung aller Messungen wurde eine Kontrollmessung eines zu Beginn gemessenen Präparates vorgenommen. Die Meßwerte entsprachen in ihrer Größenordnung und Verteilung den früher ermittelten.

Die angefertigten Autoradiogramme der Leber und Haut wurden systematisch durchgemustert. Von jedem dabei aufgefundenen markierten Kern wurde die Reflexionsintensität im Dunkelfeld gemessen. 100 Meßwerte pro Präparat wurden dann entsprechend ihrer Häufigkeitsverteilung zu einem Histogramm sortiert.

Die Messung der Silberkorndichte markierter Kerne sollte Aufschluß über deren DNS-Gehalt, bzw. ihre Ploidiestufe geben.

"Da pro Zeiteinheit jeder DNS-synthetisierende Kern die gleiche Anzahl markierter Thymidinmoleküle einbaut, ist die Silberkornzahl im Autoradiogramm bei allen markierten Kernen gleicher Ploidiestufe die gleiche" (CEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER, 1961). Ausgehend von der Diploidie normaler Parenchym- und Extraparenchymkerne war eine Aufteilung der am häufigsten auftretenden Meßwerte in verschiedene Ploidiestufen möglich.

Nach der Nomenklatur von PERA (1970) versteht man unter Euploidie (Diploidie, Tetraploidie, Oktoploidie,...) das Vorhandensein eines haploiden Satzes oder seines ganzzahligen Vielfachen. Das Vorliegen von drei oder mehr haploiden Sätzen in einer Zelle wird als Polyploidie bezeichnet. Ganzzahlige Vielfache des haploiden Satzes ohne die für das betreffende Organ typische Ploidie werden heteroploid genannt. Von der Euploidie unterscheidet man die Aneuploidie, bei der einzelne Chromosomen zuviel oder zu wenig vorhanden sind (Hyperploidie oder Hypoploidie).

Versuchsergebnisse

Die Gesamtdauer des Versuches betrug 2 Jahre. Für die Beurteilung des Versuches wurden der histologische Befund der Autoradiogramme, die Ermittlung des ^3H -Indexes nach Untersuchung der Zelldichte, die Darstellung der Silberkorndichte pro Kern in Form von Histogrammen und die histologische Untersuchung der Spontan-toten herangezogen.

I. Auswertung der Autoradiogramme

A: Unbehandelte Kontrolltiere

1. Leber

Die Autoradiogramme der Kontrollen zeigten histologisch keine Besonderheiten. Sie enthielten vor allem im Parenchym der Leber nur wenige markierte Zellen.

a) Die Prüfung der Zelldichte in der Leber ergab in 1000 Gesichtsfeldern folgende Mittelwerte:

	I.26.Woche	II.36.Woche	III.40.Woche
einkernige Parenchymzellen	12350	12400	11080
mehrkernige Parenchymzellen	510	1000	890
Gesamtparenchymzellzahl	13260	13400	11970
markierte Parenchymkerne	2	7	4
^3H -Index des Parenchyms 0,01 %		0,05 %	0,03 %
Mitoseindex	0 %	0 %	0 %
Extraparenchymzellen	12250	11840	12380
markierte Extraparenchymkerne	23	22	29
^3H -Index des Extraparenchyms	0,2 %	0,2 %	0,2 %

Das Verhältnis der ^3H -Indices Parenchym zu Extraparenchym beträgt 1 : 7, liegt also im Streubereich des früher ermittelten Wertes von 1 : 10 (Schaude).

Die drei Tötungszeitpunkte ergaben für die Zelldichte und den ^3H -Index keine wesentlichen Unterschiede.

b) Histogramme der Leber

Da die Autoradiogramme der Kontrolltiere weniger als 100 markierte Zellkerne pro Präparat aufwiesen, wurden die Meßwerte der Silberkorndichte aller Kontrollen zusammengezählt, auf 100 umgerechnet und in einem Histogramm dargestellt.

x) Parenchym

Für die Histogramme des Parenchyms wurden ganzzahlige Meßwerte (auf- und abgerundet) der Silberkorndichte entsprechend ihrer Häufigkeit geordnet und jeweils die Zusammenfassung von 4 Meßeinheiten in einer Säule dargestellt.

Danach ergab sich in dem polyploiden Organ für den diploiden Kernanteil ein mittlerer Meßwert von 10,5 ME, für den tetraploiden Kernanteil ein mittlerer Meßwert von 21 ME.

Als Hauptanteil der markierten Zellkerne fand - dem Alter der Tiere entsprechend - das Maximum der DNS-Synthese, d.h. die DNS-Verdopplung, in tetraploiden Zellkernen statt. Bei jüngeren Tieren liegt der Prozentsatz synthetisierender diploider Kerne höher.

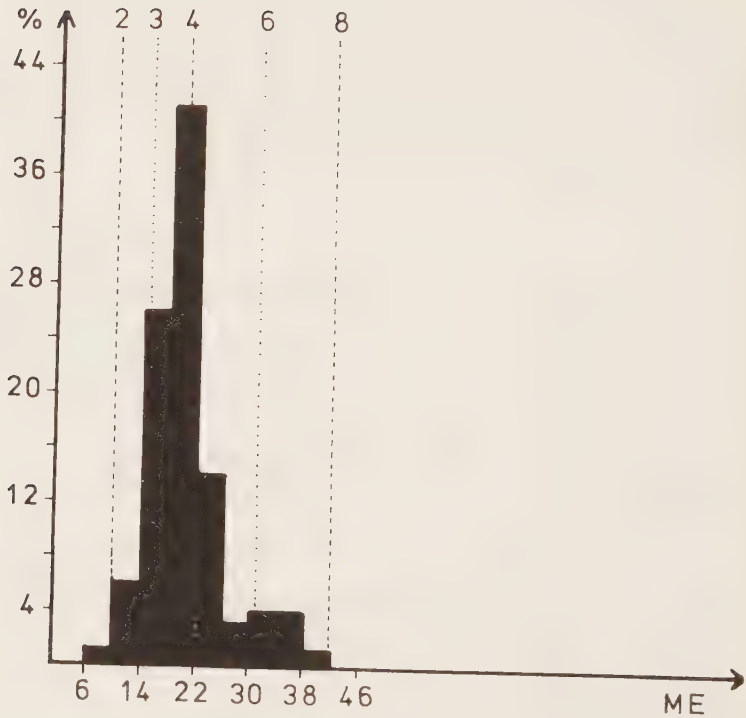


Abb. 4

Kontrolle, Parenchym

Bei der Auswertung des Ploidiespektrums sind die einzelnen Ploidiestufen immer nach ihrem Ausgangswert benannt; d.h. beispielsweise die im Histogramm als diploid bezeichnete Kerngruppe enthält zu dieser Zeit den vierfachen Chromosomensatz. Unter dem Aspekt einer nachfolgenden mitotischen Teilung wären die zwei Tochterkerne wieder diploid.

C) Extraparenchym

Entsprechend der kleineren Größe des Extraparenchyms und der dadurch bedingten geringeren Anteile im Schnitt ergaben sich für das normalerweise vorwiegend diploide Kollektiv niedrigere Meßwerte. Eine Raffung der Meßwerte wie beim Parenchym war daher nicht angezeigt, so daß jeder ganzzahlige Meßwert als selbständige Säule in der Darstellung aufgeführt wurde.

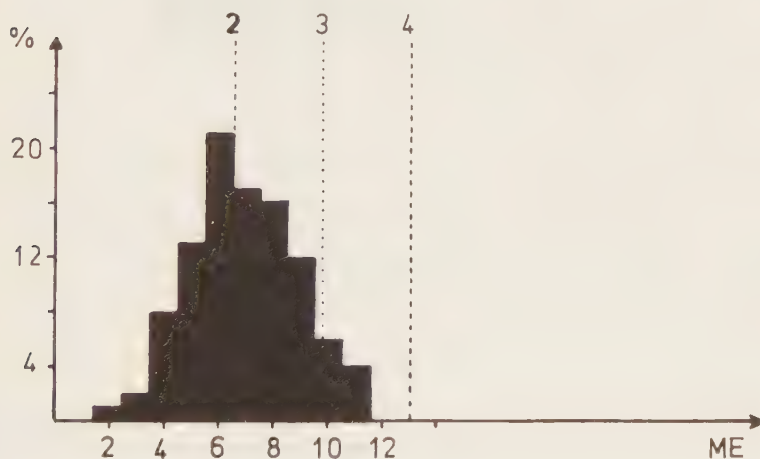


Abb. 5

Kontrolle, Extraparenchym

Nach der Häufigkeitsverteilung wurde für den diploiden Kernanteil ein mittlerer Meßwert von 6,5 ME gefunden. Tetraploide traten bei den Kontrollen nicht auf.

2. Haut

Bei der histologischen Untersuchung der Hautschnitte fielen bei den Kontrolltieren keine pathologischen Veränderungen auf.

Histogramm:

Auch hier mußten für die Darstellung des Histogrammes wegen der geringen Anzahl an markierten Zellkernen die Meßwerte aller Präparate zusammengefaßt werden.

Dabei mußte eine größere Streuung in Kauf genommen werden, da die Schnittdicke der einzelnen Präparate nicht exakt gleich war.

Die Sortierung erfolgte für jede einzelne Meßeinheit.

Der normale Zellkern des Stratum basale ist wie der normale Extraparenchymkern der Leber diploid.

Für den diploiden Kernanteil wurde hier ein mittlerer Meßwert von 4 ME, für den tetraploiden ein mittlerer Meßwert von 8 ME gefunden.

Die Differenzen der mittleren Meßwerte für die Diploidie in Parenchym, Extraparenchym und Haut beruhen auf den unterschiedlichen Zellgrößen und den dadurch bedingten verschiedenen Anschnitten.

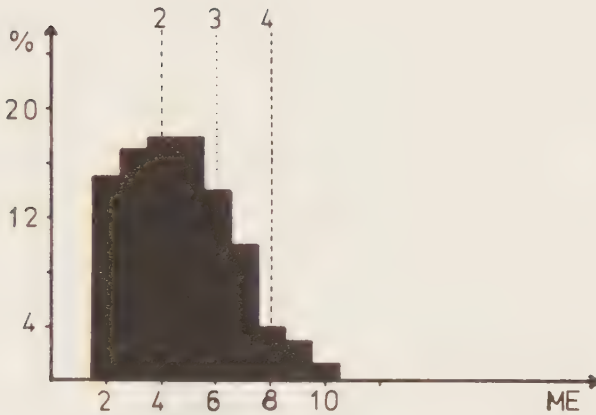


Abb. 6

Kontrolle, Haut

L: Einwirkung von A_1 (10-TPA-10)

1. Leber

Auch die Autoradiogramme der A_1 -Tiere zeigten in der Leber histologisch keine Besonderheiten. Wie bei den Kontrollen wurden vor allem im Leberparenchym nur wenige markierte Kerne gefunden.

a) Die Untersuchung der Zelldichte in der Leber ergab in 1000 Gesichtsfeldern folgende Mittelwerte:

	I.26.Woche	II.36.Woche	III.40.Woche
einkernige Parenchymzellen	11470	11730	9740
mehrkernige Parenchymzellen	470	390	680
Gesamtparenchymzellzahl	11940	12120	10420
markierte Parenchymkerne	5	0	1
^3H -Index des Parenchyms	0,04 %	0 %	0,01 %
Mitoseindex	0,02 %	0,01 %	0 %
Extraparenchymzellen	11680	13530	10940
markierte Extraparenchymzellen	49	11	17
^3H -Index d.Extraparenchyms	0,4 %	0,08 %	0,2 %

Das Verhältnis der ^3H -Indices Parenchym zu Extraparenchym beträgt 1 : 10. Auffallend ist die Verminderung der Zahl der Doppelkernigen gegenüber den Kontrollen. Dies beruht offensichtlich auf dem vermehrten Auftreten von Kernfusionen bei dieser Zellart, was bei den histologischen Übersichtspräparaten in einem gehäuften Auftreten von Langkernen erkennbar wird.

b) Histogramme

Wegen der geringen Anzahl an markierten Zellkernen vor allem im Parenchym mußten auch hier wieder die Meßwerte aller 6 Autoradiogramme herangezogen werden. Unterschiede der Meßwerte für die 3 Tötungszeitpunkte ergaben sich nicht.

4) Parenchym

Wie bei den Kontrollen überwiegt der Anteil der tetraploiden Zellkerne; oktoploide Kerne treten gar nicht auf. Das Histogrammbild entspricht der Kontrolle.

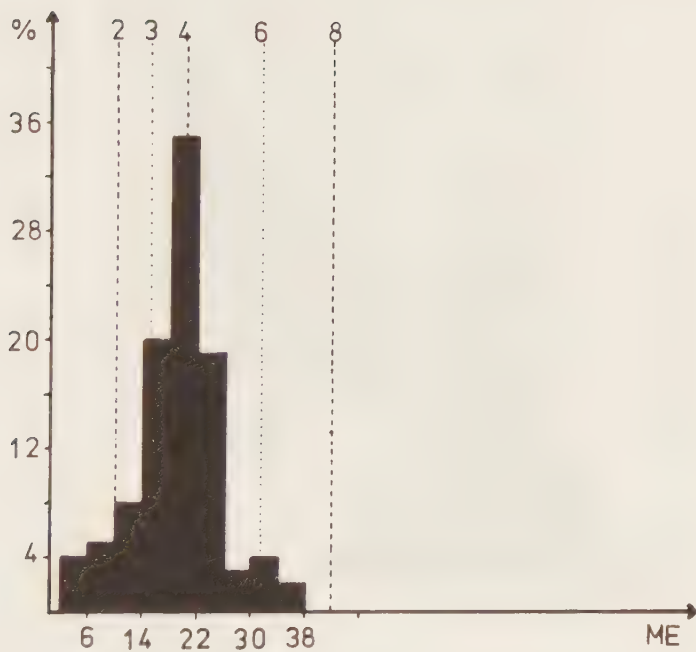


Abb. 7

A₁, Parenchym

B) Extraparenchym

Es zeigt deutlich ein Überwiegen der normalen diploiden Kerne; tetraploide Kerne fehlen.

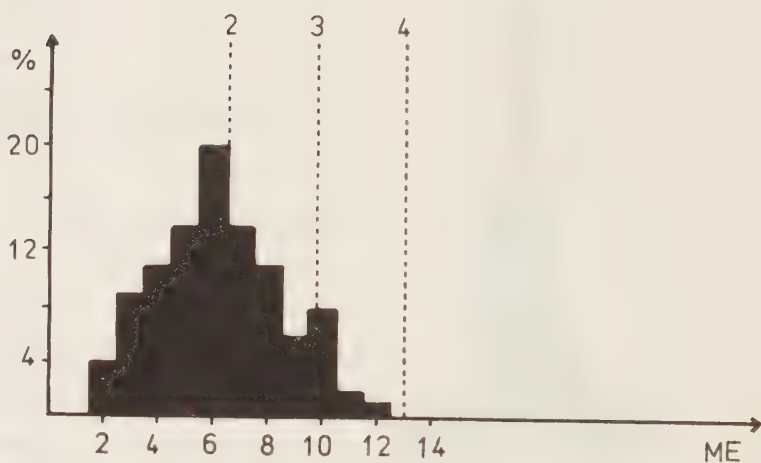


Abb. 8

A₁, Extraparenchym

Sowohl Parenchym als auch Extraparenchym verhalten sich bei der Histogrammdarstellung wie die Kontrollen.



Markierte Zellen eines Haarbulbus

Vergrößerung 12,5 x 100

2. Haut

Hier fielen bei der histologischen Untersuchung der Autoradiogramme vom Tötungszeitpunkt abhängige Veränderungen der Haut auf.

Die Hautpräparate A₁I (26. Woche) zeigten eine erhebliche Hyperplasie, die auch makroskopisch schon sichtbar war. Es fiel eine Hyperkeratose und eine starke Verbreiterung des Stratum basale und granulosum auf. Außerdem war eine Papillomatose ausgeprägt. Es wurden Hornperlenbildungen, teilweise mit parakeratotischer Verhornung gefunden. Das Stroma war gefäßreich und von zahlreichen Leukocyten infiltriert. An einer Stelle befand sich eine Ulceration.

Die Hautpräparate A₁II (36. Woche) ließen eine Regression der Hautveränderungen erkennen. Die Haut zeigte aber immer noch gegenüber den Kontrollen eine Hyperplasie. Hyperkeratose und Verbreiterung des Stratum basale waren in vermindertem Maße noch vorhanden. Hornperlen wurden nicht mehr gefunden. Auch die Papillomatose zeigte Rückläufigkeit. Im Stroma, das hier frei war von Zellinfiltrationen, fielen neben einer Gefäßvermehrung zahlreiche kollagene Fasern auf.

Die Präparate A₁III (40. Woche) entsprachen in ihrem histologischen Bild A₁II. Die beschriebenen Veränderungen traten allerdings nur noch an einzelnen Stellen auf. Kollagene Fasern fielen in diesem Maße nicht mehr auf. Eine Hyperplasie der Haut war nicht mehr vorhanden.

Alle Autoradiogramme wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine Vermehrung markierter Zellkerne auf, die vorwiegend in der Basalzellschicht und um die Haarbulbi gefunden wurden. Insgesamt nahm die Zahl der markierten Zellen mit zunehmender Versuchsdauer ab.

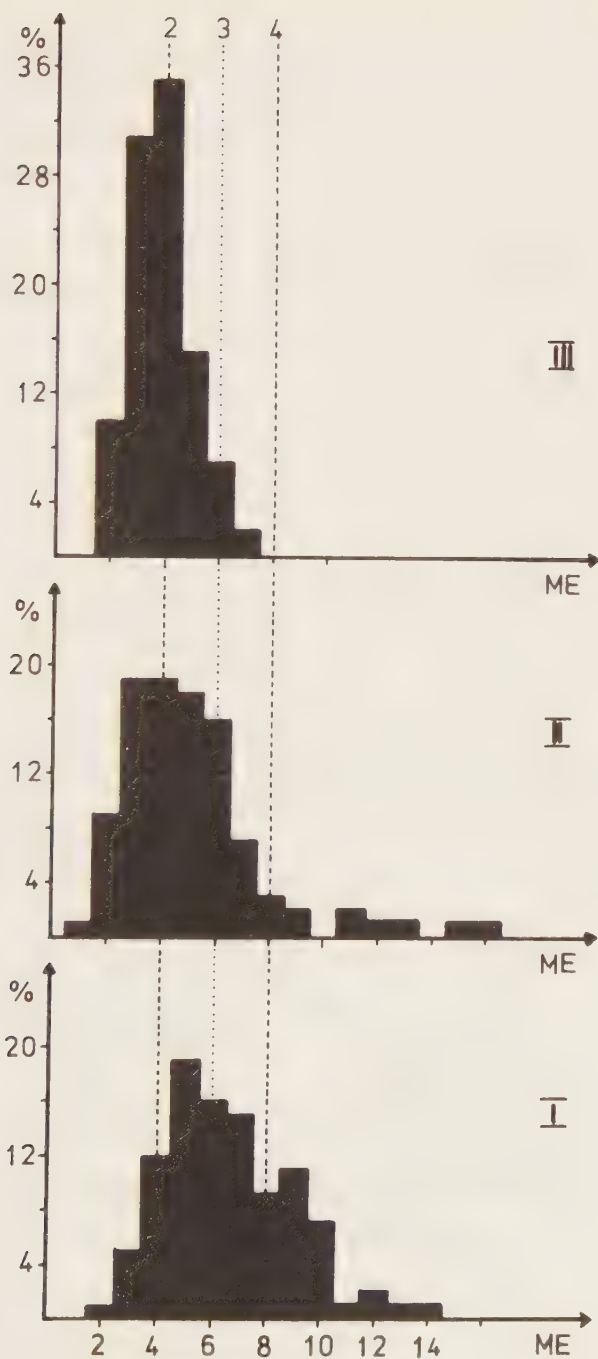


Abb. 9

Histogramme: A₁ , Haut; I: 26.Woche, II: 36.Woche, III: 40.Woche

Auch hier werden wie bei der histologischen Untersuchung von den Tötungszeitpunkten abhängige Unterschiede deutlich:

A₁I und A₁II weisen gegenüber der Kontrolle eine Polyploidisierung auf, die bei A₁III nicht mehr vorhanden ist.

Die Verteilung der Meßwerte bei A₁I läßt neben einer Hypertetraploidie eine Hyperdiploidie erkennen, die bei A₁II rückläufig ist und bei A₁III nicht mehr erscheint.

Das Histogramm von A₁III entspricht dem der Kontrolle. Es handelt sich also um eine "reversible Hyperdiploidie".

C und D: Einwirkung von DÄNA und DÄNA + Aceton

Die Tiere beider Versuchsgruppen erhielten innerhalb von 8 Wochen eine Gesamtdosis von ca. 480 mg/kg DÄNA.

1. Leber

Da sich bei der Auswertung der Versuchsergebnisse zwischen der DÄNA- und DÄNA + Aceton-Behandlung in der Leber keine unterschiedlichen Auswirkungen feststellen ließen, werden beide Versuchsgruppen zusammen abgehandelt.

Bei der histologischen Untersuchung der Autoradiogramme wurden in zunehmendem Maße Gallengangswucherungen und Cystenbildungen, in den Präparaten der 40. Woche auch schon ausgedehntere Hämangioendotheliome gefunden.

Bei einem der in der 36. Woche getöteten Tiere zeigte sich makroskopisch ein gut abgrenzbarer Leber-Tumor. Histologisch handelt es sich um ein Leberzell-Carcinom.

a) Bei der Untersuchung der Zelldichte in den tumorfreien Leberanteilen wurden in 1000 Gesichtsfeldern folgende Mittelwerte gefunden:

	I. 26.Woche	II. 36.Woche	III.40.Woche
einkernige Parenchymzellen	9800	10730	11320
mehrkernige Parenchymzellen	615	720	353
Gesamtparenchymzellzahl	10415	11450	11673
markierte Parenchymkerne	55	110	136
^3H -Index des Parenchyms	0,5 %	0,9 %	1,2 %
Mitoseindex	0,09 %	0,08 %	0,06 %
Extraparenchymzellen	11830	12360	11393
markierte Extraparenchymkerne	90	136	169
^3H -Index des Extraparenchyms	0,7 %	1,1 %	1,4 %

Auffallend ist im Zellbild die Zunahme der einkernigen und die Abnahme der doppelkernigen Parenchymzellen während des Versuchsverlaufes.

Das Verhältnis der ^3H -Indices Parenchym zu Extraparenchym beträgt 1 : 1,2. Die Ermittlung des ^3H -Indexes im isolierten Leberzell-Carcinom ergab für das Parenchym 6 % und für das Extraparenchym 3 %.

Der Mitoseindex betrug hier 0,9 %.

Die Werte des ^3H -Indexes für Parenchym und Extraparenchym und der Mitoseindex zeigen gegenüber den Kontrollen eine deutliche Erhöhung. Vergleicht man die Indices der verschiedenen Tötungszeitpunkte, so fällt das Ansteigen des ^3H -Indexes während der Versuchsdauer auf.

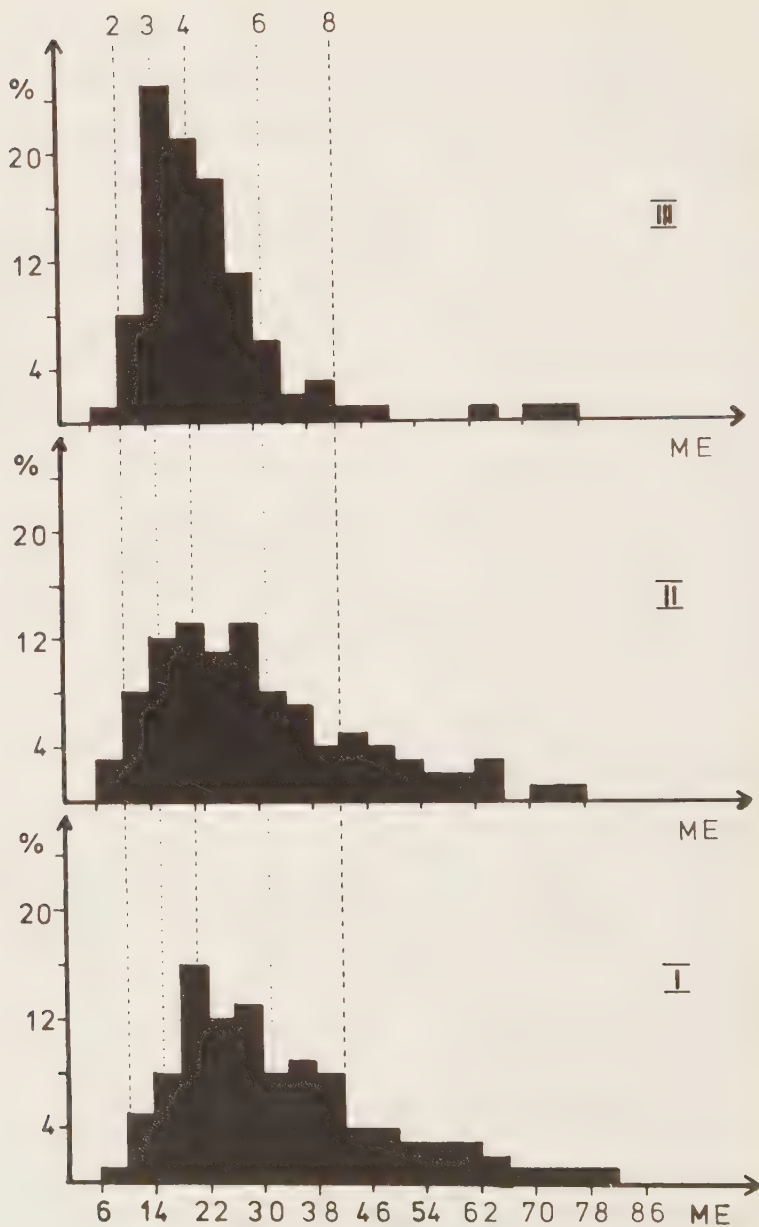


Abb. 10

DNA, Parenchym

b) Histogrammdarstellung

a) Parenchym

Alle drei Histogramme weisen gegenüber der Kontrolle eine Polyploidisierung auf, die von D II nach D III rückläufige Tendenz zeigt.

Während D I nur eine Hypertetraploidie erkennen läßt, wird bei D II und D III neben dem Anstieg der hypertetraploiden auch eine Zunahme der hyperdiploiden Zellkerne deutlich. Auch der heteroploide Kernanteil steigt an (möglicherweise sind hier noch hyperdiploide Kerne miterfaßt).

Das Histogramm des Carcinompräparates zeigt neben der Polyploidisierung eine ausgeprägte Hypertetraploidie:

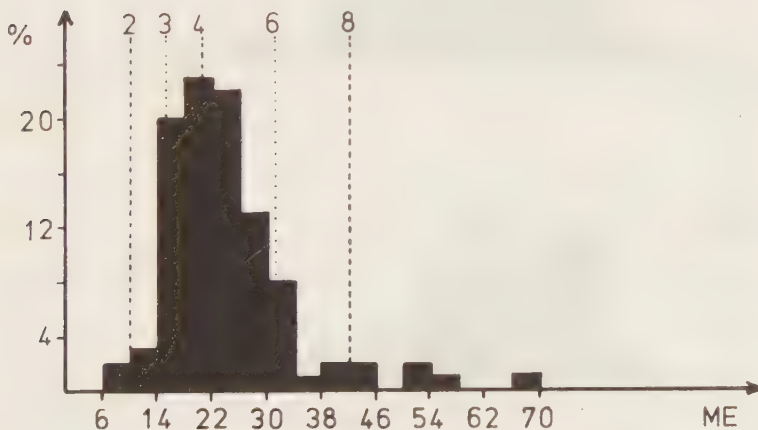


Abb. 11

DÄNA, Leberzell-Carcinom, Parenchym

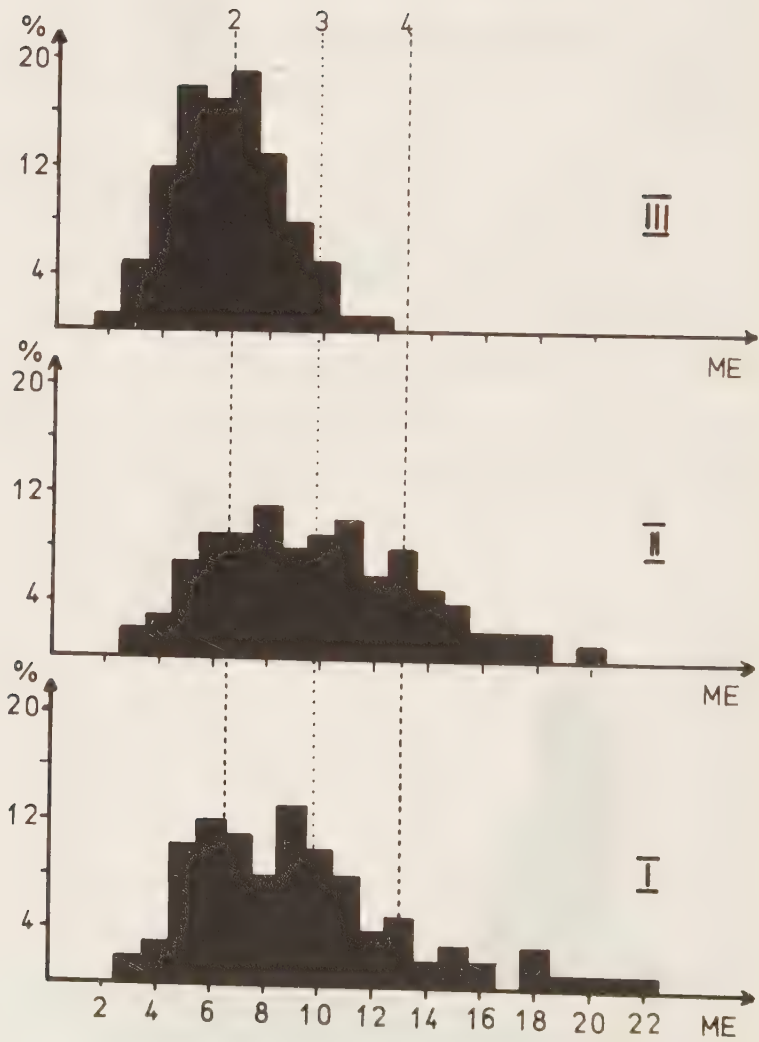


Abb. 12

DÄNA, Extraparenchym

B) Extraparenchym

Der im Parenchym gefundene Polyploidisierungseffekt unter der Einwirkung von DÄNA ist auch in den Histogrammen des Extraparenchyms ausgeprägt. Die rückläufige Tendenz der Polyploidisierung, die sich schon im Parenchym darstellte, kommt hier bei D III durch das völlige Verschwinden der polyploiden Kerne am deutlichsten zum Ausdruck.

D I und D II zeigen eine Vermehrung des hyperdiploiden Kernanteiles; bei D II erscheint dazu deutlicher eine Hypertetraploidie, die dann bei D III fehlt.

D III ist insgesamt zu kleineren Werten hin verschoben. Dies ist durch das gehäufte Auftreten von markierten Gallengangsepithelien auf Grund der zunehmenden Gallengangswucherungen zu erklären. Diese langgestreckten Epithelien bieten andere Anschnittsmöglichkeiten als die übrigen Extraparenchymzellen. Um das zu bestätigen, wurden markierte Gallengangsepithelien gesondert gemessen und ihre Meßwerte in einem Histogramm sortiert.

Der normale Wert der Gallengangsdiploidie ist nicht zu ermitteln, da bei Kontrollen keine markierten Gallengangsepithelien gefunden wurden. Wir müssen aber eine Hyperdiploidie annehmen, da hier schon ausgeprägte Hämangioendotheliome entwickelt sind.

Werden die Meßwerte der Gallengangsepithelien von den übrigen Meßwerten getrennt, so ergibt sich bei D III trotzdem gegenüber der Kontrolle noch eine Verschiebung der Säulen zu höheren Werten hin.

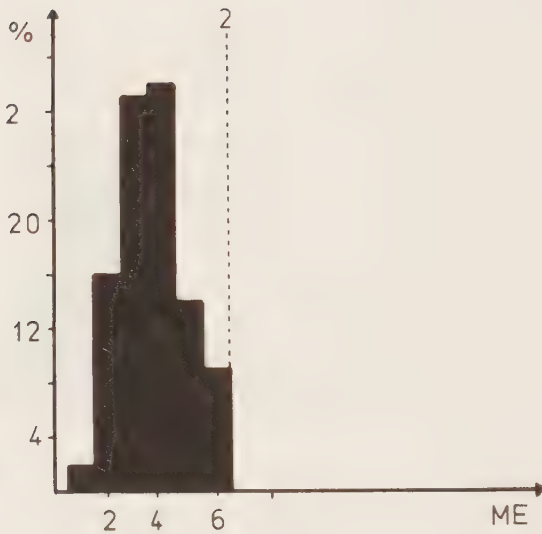


Abb. 13

Markierte Gallengangsepithelien aus Gallengangswucherungen;

2 = diploider Meßwert des Leberendothels

Eindeutig werden Hyperdiploidie und Hypertetraploidie im Histogramm des Leberzell-Carcinoms, in dem keine markierten Gallengangsepithelien gefunden wurden, die das Bild durch zu niedrige Werte verfälschen können:

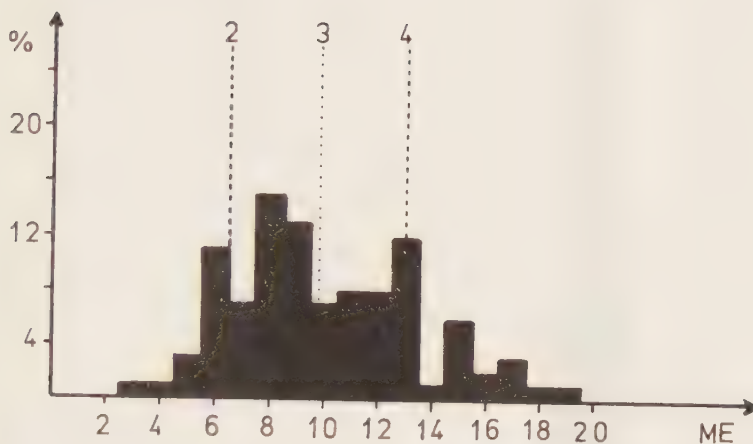


Abb. 14

DÄNA, Leberzell-Carcinom, Extraparenchym

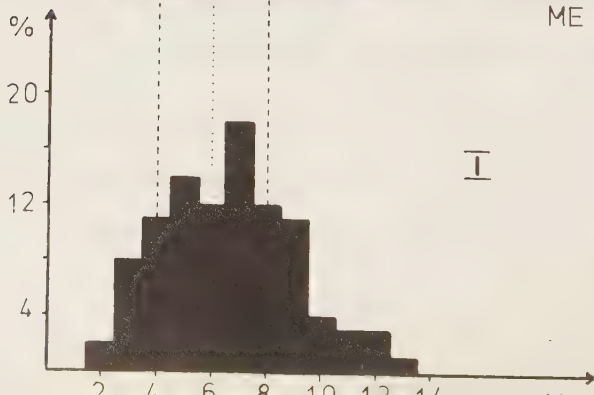
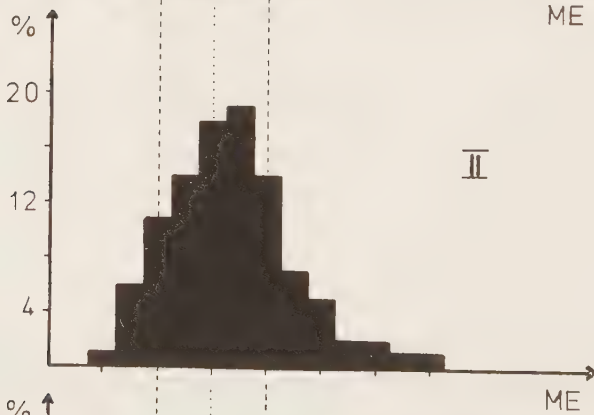
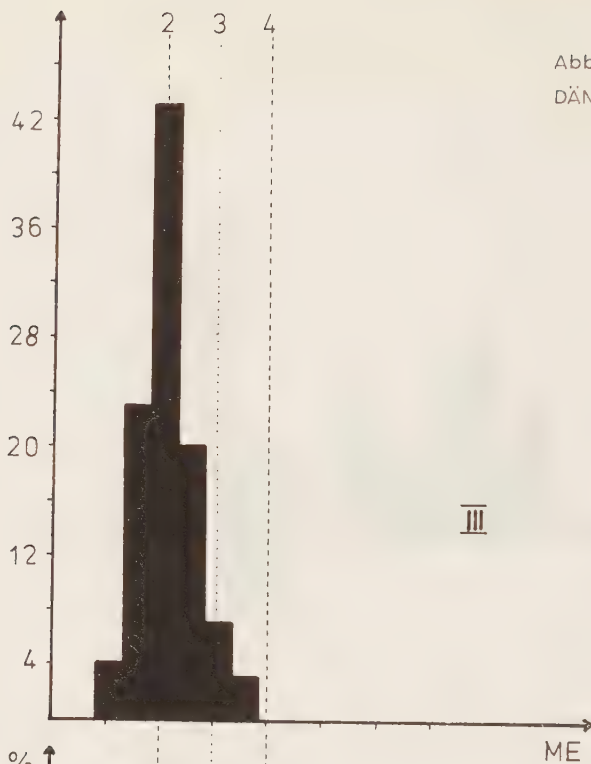
2. Haut

Bei der makroskopischen und histologischen Untersuchung der Haut aller allein mit DÄNA behandelten Tiere wurden keine pathologischen Veränderungen gefunden.

Die zusätzlich mit Aceton bepinselten Tiere wiesen geringfügige Veränderungen in ihrer Haut auf. Makroskopisch wurde unter der Behandlung im Pinselungsbereich eine Rötung beobachtet.

Histologisch fand sich unabhängig von den Tötungszeitpunkten bei 4 Autoradiogrammen eine leichte Hyperkeratose und stellenweise eine geringe Verbreiterung des Stratum basale, aber keine Papillomatose.

Abb. 15
DÄNA, Haut



In den Histogrammen der Haut ließ sich ebenfalls wie in der Leber kein Unterschied zwischen der reinen DANA- und der kombinierten DANA + Aceton-Behandlung nachweisen. Sie wurden deshalb wie bei der Leber zusammengefaßt. Anzahl und Verteilung der vermehrt markierten Zellkerne innerhalb der Hautschichten waren gleich und entsprachen der bei A₁ gefundenen. Auch hier konnte eine Abnahme der Anzahl an markierten Kernen von D I nach D III beobachtet werden.

Wie schon bei A₁ treten bei D I und D II eine Polyploidisierung und eine Hyperdiploidie auf. Beide Merkmale werden bei D III nicht mehr gefunden. Das Histogramm von D III entspricht dem von A₁III. Es handelt sich also offensichtlich auch hier um eine "reversible Hyperdiploidie".

E: Einwirkung von DANA in Kombination mit A₁

Die Gesamtdosis DANA betrug für die Tiere dieser Versuchsgruppe ebenfalls ca. 480 mg/kg.

1. Leber

Auch in diesen Autoradiogrammen traten in zunehmendem Maße schon in der 36. Woche ausgeprägte Gallengangswucherungen und Cystenbildungen auf. In einem Präparat der 36. Woche wurde ein Leberzell-Carcinom, in einem anderen ein Hämangi endotheliom gefunden. In den Autoradiogrammen der 40. Woche wurden ein Hämangi endotheliom und ein Hepatom diagnostiziert.

- a) Die Untersuchung der Zelldichte und die Ermittlung des ^3H -Indexes ergab in 1000 Gesichtsfeldern aus tumorfreien Gewebsbezirken folgende Mittelwerte:

	I. 26.Woche	II. 36.Woche	III. 40.Woche
einkernige Parenchymzellen	9180	10230	10060
mehrkernige Parenchymzellen	360	500	347
Gesamtparenchymzellzahl	9540	10730	10407
markierte Parenchymkerne	47	82	120
^3H -Index des Parenchyms	0,5 %	0,7 %	1,2 %
Mitoseindex	0,06 %	0,18 %	0,04 %
Extraparenchymzellen	11230	12610	11787
markierte Extraparenchymkerne	82	76	162
^3H -Index des Parenchyms	0,7 %	0,6 %	1,4 %

Der im separaten Leberzell-Carcinom ermittelte ^3H -Index betrug für das Parenchym 4 % und für das Extraparenchym 3 %. Für die Mitosen der Parenchymzellen wurde ein Index von 0,6 % errechnet.

Die Indices auch dieser Gruppe sind gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht und entsprechen den bei DANA gefundenen Werten.

Sie zeigen wie bei der vorhergehenden Gruppe einen Anstieg während der Versuchsdauer.

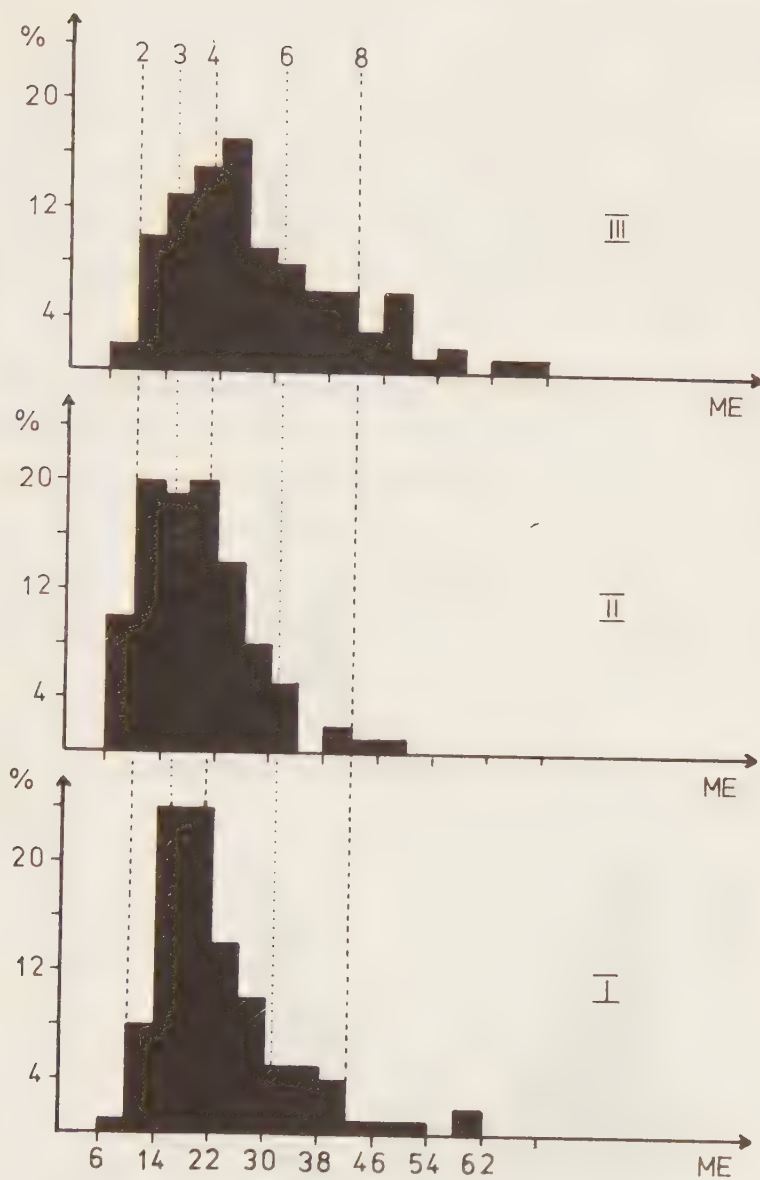


Abb. 16

DÄNA+A₁, Parenchym

b) Histogrammdarstellung

x) Parenchym (s. Abb. 16)

Allen Histogrammen gemeinsam ist wiederum die Polyploidisierung, die hier nur scheinbar keine rückläufige Tendenz zeigt. Ein genauerer Vergleich von DA_1II und DA_1III läßt vermuten, daß sich DA_1II , obwohl jünger, in einem weiter fortgeschrittenen Stadium befindet als DA_1III .

Dafür spricht auch die bei DA_1II überwiegende Hyperdiploidie, während bei DA_1III noch eine Hypertetraploidie im Vordergrund steht und eine Hyperoktoploidie angedeutet ist.

Im Histogramm dieses Leberzell-Carcinoms fällt die Zunahme der Hyperdiploidie auf im Gegensatz zum Leberzell-Carcinom der DÄNA-Gruppe, bei dem noch die Hypertetraploidie im Vordergrund steht.

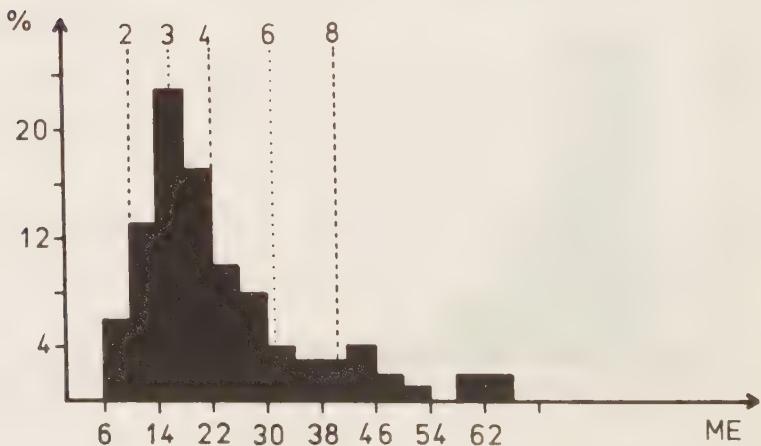


Abb. 17

DÄNA + A_1 , Leberzell-Carcinom, Parenchym

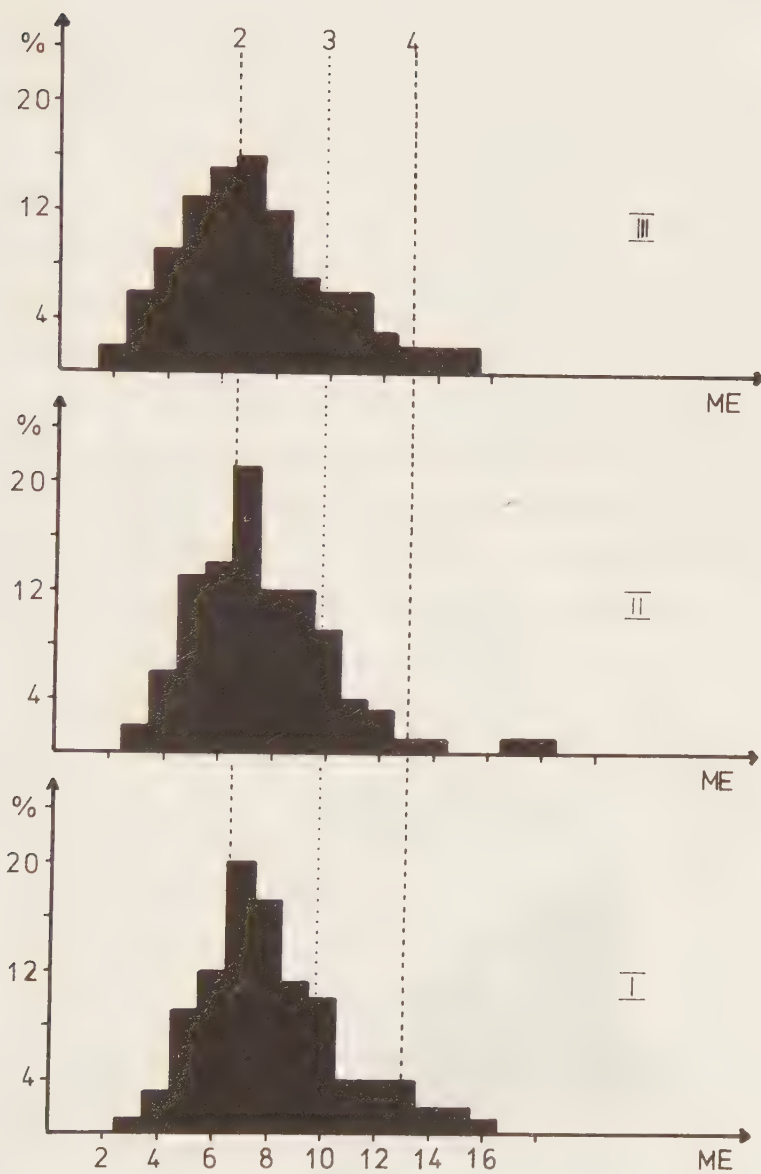


Abb. 18

DANA+A₁, Extraparenchym

B) Extraparenchym (s. Abb. 18)

Wie unter der Einwirkung von DÄNA allein zeigt sich auch hier eine Polyploidisierung, für deren Rückläufigkeit das gleiche gilt, wie schon unter A) gesagt wurde.

Die Histogramme zeigen wiederum den Einfluß der markierten Gallengangsepithelien, dennoch besteht gegenüber der Kontrolle eine Verschiebung zu hyperploiden Werten hin.

Alle drei Präparate dieser Gruppe weisen hyperploide Meßwerte auf.

Auch das Histogramm eines isolierten Hämangioendothelioms zeigt eine Hyperdiploidie, aber gleichzeitig durch den Einfluß der markierten Gallengangsepithelien das Phänomen der Verschiebung zu kleineren Werten hin.

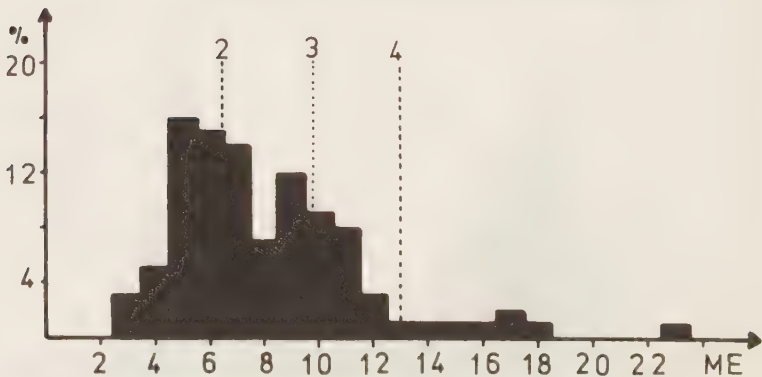


Abb. 19

DÄNA + A₁, Hämangioendothelium, Extraparenchym

2. Haut

Bei der histologischen Untersuchung der Haut fielen in stärkerem Maße pathologische Veränderungen auf, als sie die vorhergehende Versuchsgruppe zeigte. Sie entsprachen den bei A₁ gefundenen.

Die Hautpräparate DA₁I zeigten eine Hyperplasie. Neben einer Hyperkeratose wurden ein ausgeprägtes Stratum lucidum, eine starke Verbreiterung des Stratum basale, ein mehrschichtiges Stratum granulosum, vereinzelt Hornperlen und parakeratotische Verhornung und eine Papillomatose gefunden. An einer Stelle war eine Ulceration mit darunterliegendem Narbengewebe zu sehen. Im Stroma traten vermehrt Leukocyten und Gefäße auf.

DA₁II wies diese Veränderungen in vermindertem Maße auch noch auf. Das Stratum basale war gegenüber den Kontrollen noch deutlich verbreitert, zeigte aber nicht mehr diese Vielschichtigkeit wie bei DA₁I. Ein Stratum granulosum trat nur ganz vereinzelt auf. Hornperlen und Parakeratose wurden nicht mehr gefunden. Eine Papillomatose war noch ausgeprägt. Das Stroma zeigte keine Zellinfiltration mehr, aber Fibrocyten und kollagene Fasern erschienen vermehrt.

Bei DA₁III waren die Veränderungen weiter rückläufig. Neben einer geringen Hyperkeratose wurden nur noch vereinzelt eine Verbreiterung des Stratum basale und eine Papillomatose gefunden. Das Stroma war hier ausgesprochen faserreich.

Die Zahl der markierten Kerne war gegenüber den Kontrollen deutlich vermehrt; sie nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab, allerdings nicht in gleichem Maße wie bei A₁.

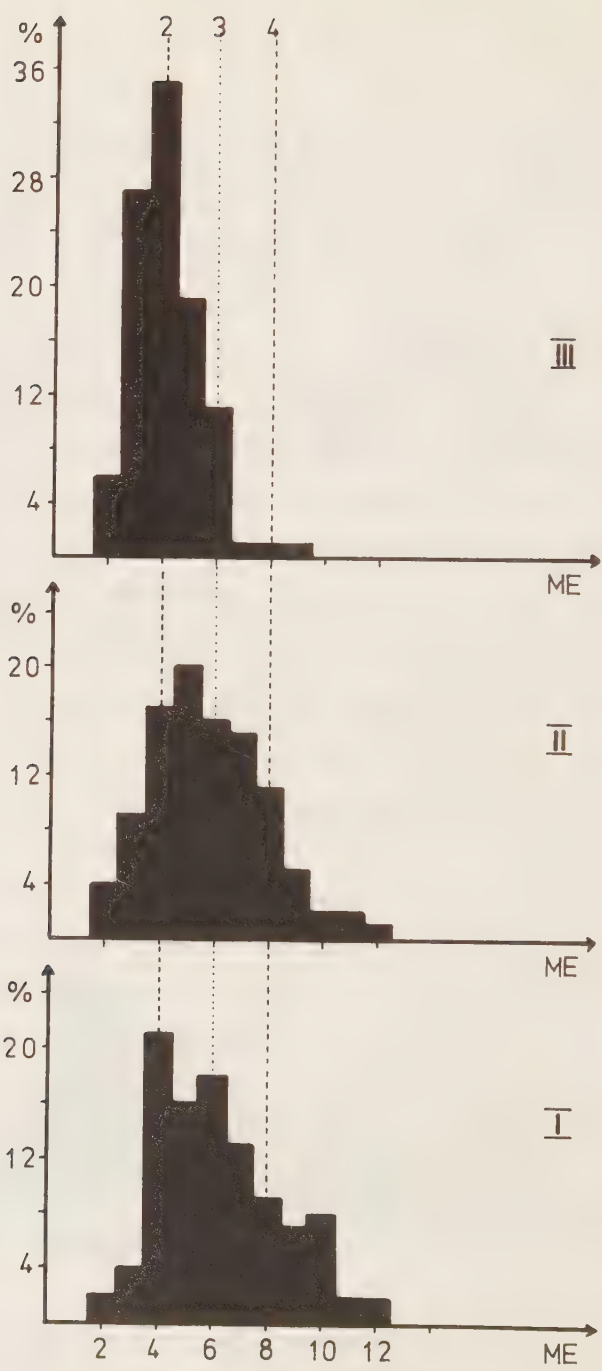


Abb. 20

DANA+A₁, Haut

Histogramme: (s. Abb. 20)

Die Histogramme der Haut zeigen wie die von A_1 und DÄNA eine Polyploidisierung mit rückläufiger Tendenz.

Bei DA_1II tritt eine Hyperdiploidie auf. Um diese Hyperdiploidie zu überprüfen, wurden die markierten Zellen eines Präparates nochmals mit verschiedener Verstärkung gemessen.

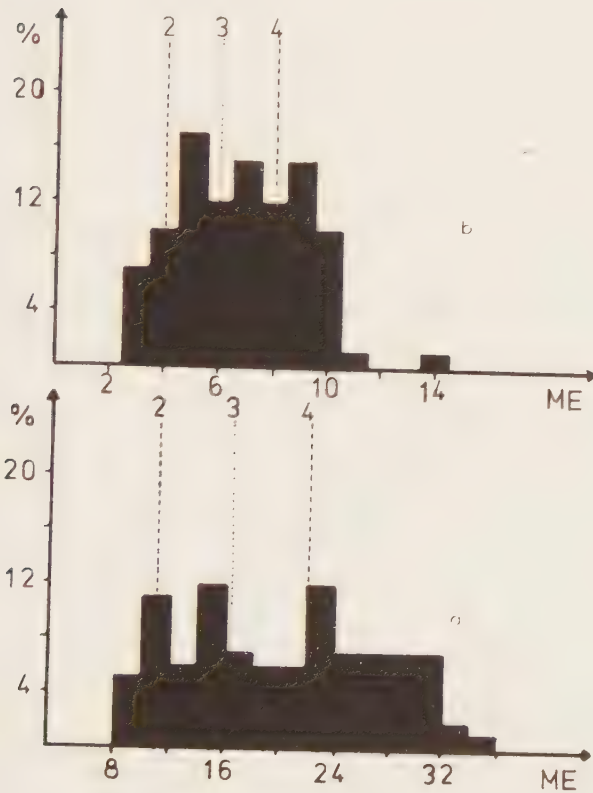


Abb. 21

DÄNA + A_1 , 36. Woche, Haut

a: Verstärkung 1,4 KV

b: Verstärkung 1,2 KV

In den Histogrammen beider Verstärkungen erscheint die Hyperdiploidie deutlich. Auch die Hypertetraploidie ist ausgeprägt. DA_1III entspricht dem Bild von $D III$ und A_1III . Eine Hyperdiploidie ist nicht mehr zu sehen, sie ist also auch hier reversibel.

II. Histologische Untersuchung der Spontanoten

A: Unbehandelte Kontrolltiere

Von 30 eingesetzten Kontrolltieren starben 2 Tiere spontan nach ca. 18 Monaten an einer histologisch diagnostizierten Leukose. Das entspricht nach statistischen Ermittlungen der physiologischen Sterblichkeit der Maus. Die Überlebenden Tiere wurden nach Versuchsbeendigung getötet und untersucht. Tumoren traten nie auf.

Makroskopisch und histologisch wurden in der Haut keine Veränderungen beobachtet.

B: Einwirkung von A₁

Die Spontansterblichkeit dieser Versuchsgruppe war gegenüber den Kontrollen nicht erhöht. Von 30 eingesetzten Tieren starben ebenfalls 2. Auch hier war die jeweilige Todesursache eine Leukose.

Bei einem Tier trat nach der Behandlung mit A₁ ein papillomatöser Hauttumor auf, der sich im Laufe des Versuches wieder vollständig zurückbildete. Andere Tumoren wurden nicht gefunden.

Bei der histologischen Untersuchung der Haut fiel auf, daß im Vergleich zu den Kontrolltieren alle Tiere Hautveränderungen im Sinne einer Hyperkeratose aufwiesen. Bei 2 Tieren fanden wir eine deutliche Verbreiterung des Stratum basale, bei 1 außerdem eine ausgeprägte Papillomatose sowie eine Leukocyten- und Gefäßvermehrung im Stroma.

C und D: Einwirkung von DANA und DANA + Aceton

Alle Tiere starben spontan in einem Zeitraum von 54 Wochen.
In jedem Falle war die Todesursache ein Tumor oder eine Ver-
blutung aus einer Lebercyste.

Der erste Tumor, ein verhornendes Plattenepithel-Carcinom der
Halsregion, trat in der 18. Woche auf. Die allgemeine Sterb-
lichkeit begann in der 22. Woche und hatte dann den folgenden
Verlauf:

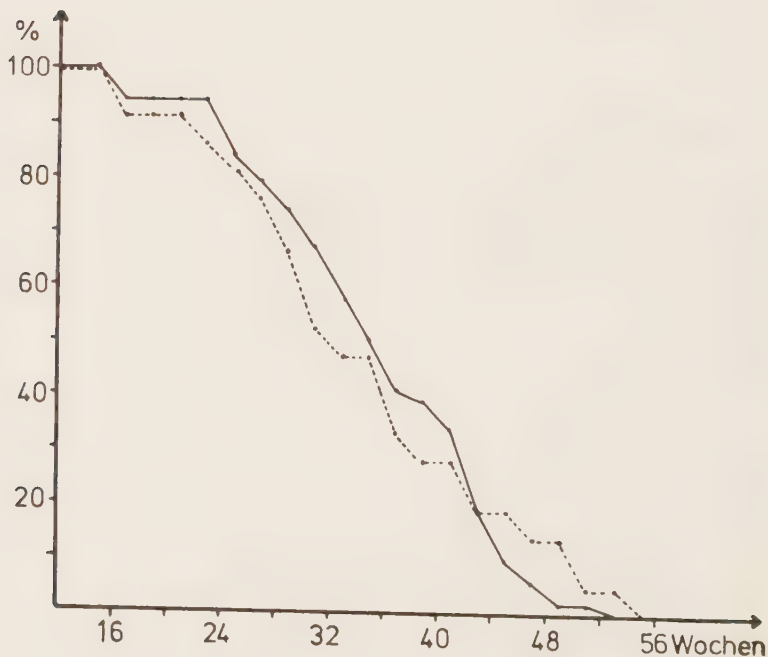


Abb. 22
Sterblichkeitsverlauf

— — — DANA
· · · DANA+A₁

Die Tumoren der Leber verteilten sich folgendermaßen:

(s. Abb. 24)

24 % der Tiere hatten nur Leberzell-Carcinome, bei weiteren 24 % wurden Hämangioendotheliome und Cysten diagnostiziert, und 49 % der Tiere wiesen sowohl Leberzell-Carcinome als auch Hämangioendotheliome in der Leber auf.

In 47 % der Präparate wurde eine Metastasierung der Leberzell-Carcinome in die Lungen beobachtet.

Daneben wurden bei 50 % der Tiere verhornende Plattenepithel-Carcinome des Vormagens und bei 6 % verhornende Plattenepithel-Carcinome der Speicheldrüsen gefunden.

Bei einem früheren DÄNA-Versuch an männlichen Albinomäusen (SCHAUDE, MICHEL) wurden 3,5 % Leberzell-Carcinome, 93 % Hämangioendotheliome und 3,5 % Leberzell-Carcinome und Hämangioendotheliome diagnostiziert. In diesem Versuch starben alle Tiere innerhalb der 22. bis 29. Woche. Möglicherweise sind diese Differenzen durch die niedrigere DÄNA-Dosierung bedingt, die auch für den langsameren Sterblichkeitsverlauf verantwortlich zu machen ist. In unserem Versuch liegt die Sterblichkeit in einem Zeitraum von 22 bis 54 Wochen.

Daraus ergibt sich der Schluß, daß die Tiere bei höherer DÄNA-Dosierung (Gesamtdosis 1240 mg/kg) gar nicht die Ausbildung von Leberzell-Carcinomen erleben, da sie vorher durch ihre Hämangioendotheliome und Cysten in der Leber an Verblutung zugrunde gehen, während bei langsamerer Entstehung auch für die Ausbildung von soliden Tumoren Zeit bleibt.

Während die Bildung der Hämangioendotheliome in der Leber eher kontinuierlich ansteigt, setzt die Entstehung der Leberzell-Carcinome und der Plattenepithel-Carcinome des Vormagens später, in der 42. Woche, ein. (S. Abb. 23)

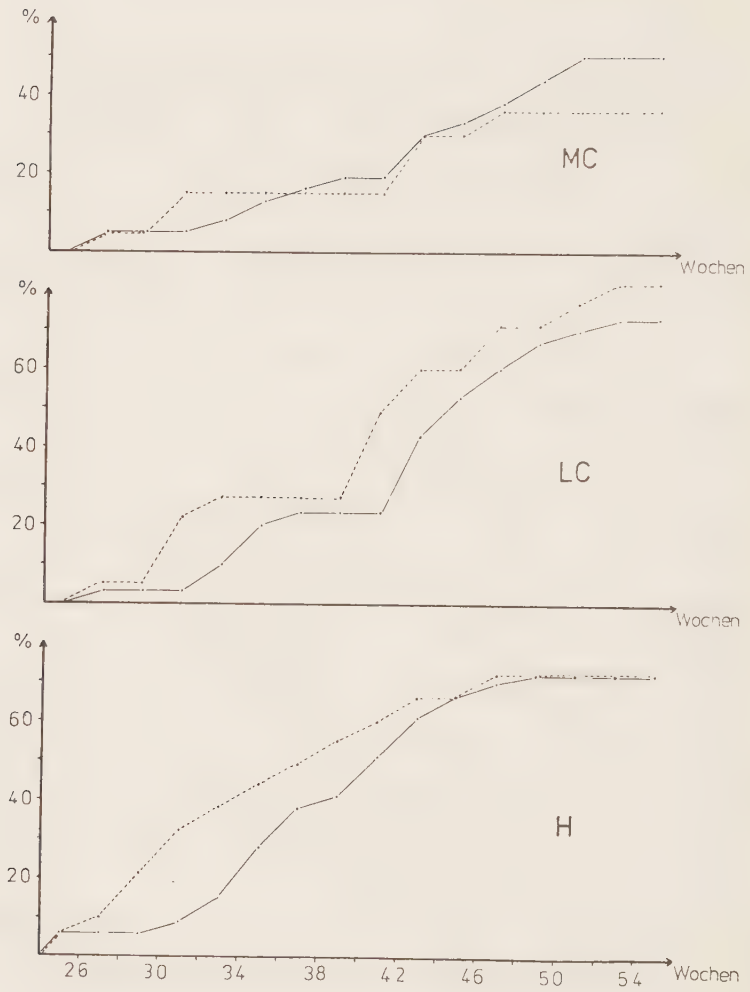


Abb. 23

H: Hämangioendotheliome

LC: Leberzell-Carcinome

MC: Magen-Carcinome

— DANA

- - DANA+A1

Bei der histologischen Untersuchung der Haut fielen bei den Tieren, die mit DÄNA allein behandelt wurden, keine Veränderungen auf.

Dagegen zeigten die Hautpräparate der mit DÄNA und Aceton behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen bis zur 42. Woche eine Hyperkeratose. Bei zwei Spontan-toten vor der 42. Versuchs-woche wurden daneben auch eine geringfügige Verbreiterung des Stratum basale und eine Zell- und Gefäßvermehrung des Stromas beobachtet. Nach der 42. Woche wurden bei dieser Versuchsgruppe keinerlei Hautveränderungen mehr gefunden. Hauttumoren traten nicht auf.

E: Einwirkung von DÄNA in Kombination mit A₁

Wie bei der vorhergehenden Gruppe starben alle Tiere spontan in einem Zeitraum von 56 Wochen. Vergleicht man den Sterblichkeitsverlauf der DÄNA- und DÄNA+A₁-Gruppen miteinander, so läßt sich kein wesentlicher Unterschied feststellen. (S. Abb.22) Die allgemeine Sterblichkeit beginnt auch hier in der 22. Woche. Ursachen für den Spontan-tod waren Tumoren oder Verblutungen aus Lebercysten.

Die histologische Untersuchung ergab folgende Tumorverteilung: Bei 28 % der Tiere wurden - davon bei 50 % schon in die Lungen metastasierende - Leberzell-Carcinome, bei 17 % Hämangioendotheliome und Cysten in der Leber und bei 55 % sowohl Hämangioendotheliome als auch Leberzell-Carcinome gefunden. 46 % der Tiere wiesen verhornende Plattenepithel-Carcinome des Vormagens auf.

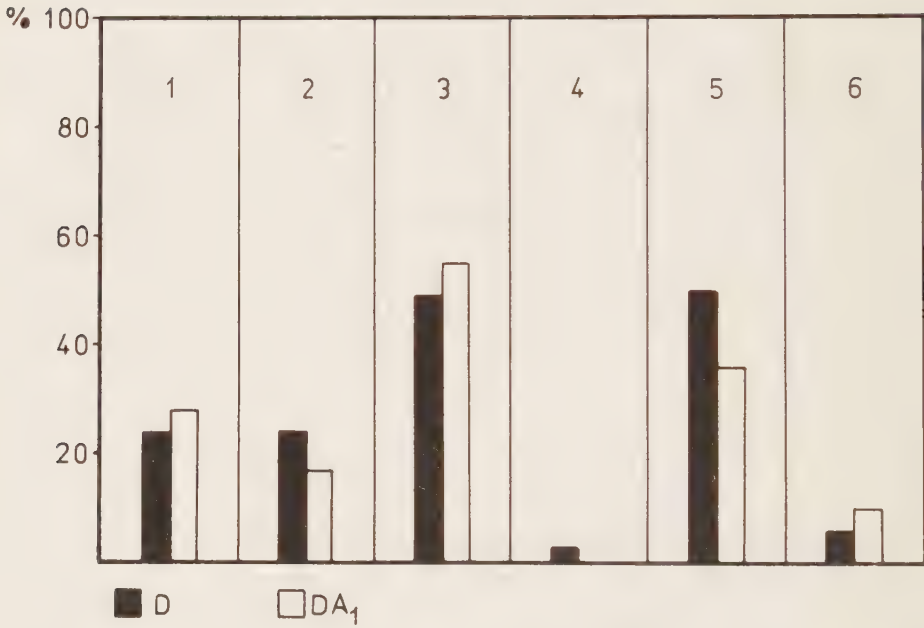


Abb. 24

Tumorhäufigkeit und Tumorverteilung

1: Leberzell-Carcinome

2: Hämangioendotheliome und Cysten

3: Leberzell-Carcinome und Hämangioendotheliome

4: ohne Lebertumoren

5: Magen-Carcinome

6: weitere Tumoren

Die DÄNA + A₁-Kombination unterscheidet sich also in Tumorhäufigkeit und Tumorverteilung nicht von der reinen DÄNA-Gruppe. (S. Abb. 24 und Tab. S. 50)

Auch die Carcinom- und Hämangioendotheliombildung in Abhängigkeit von der Zeit stimmt bei beiden Gruppen überein. (S. Abb. 23)

Die Hautpräparate der Spontanototen dieser Gruppe zeigten in 11 Fällen histologische Veränderungen:

In 6 Präparaten wurde eine Hyperkeratose gefunden; bei 7 Präparaten fiel eine leichte Verbreiterung des Stratum basale auf, 4 davon waren daneben auch papillomatös verändert. In zwei Präparaten wies das Stroma eine Zell- und Gefäßvermehrung auf.

Insgesamt waren auch hier die Veränderungen rückläufig; Papillomatose und Stromareaktion wurden nach der 44. Woche nicht mehr beobachtet.

Bei einem Tier trat während des Versuches ein Hauttumor am Rücken, allerdings außerhalb des behandelten Areals, auf. Es wurde in der 32. Versuchswoche getötet. Histologisch handelte es sich um ein hyperkeratotisches Papillom.

Tumorhäufigkeit und Tumorverteilung der Spontantumoren

n = 23

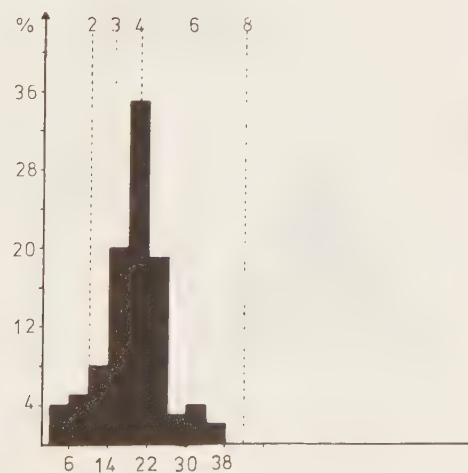
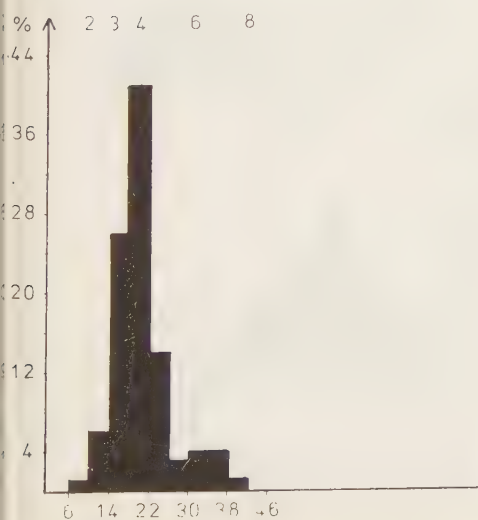
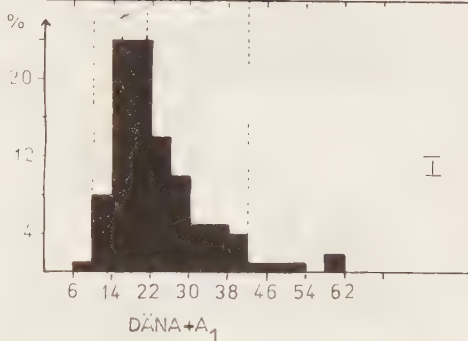
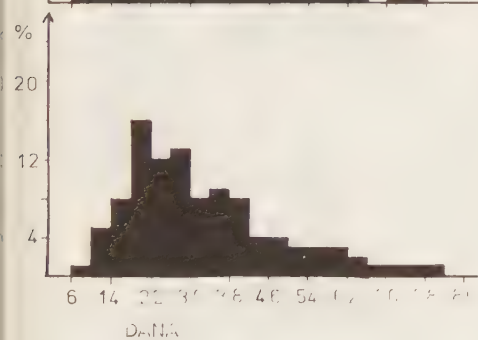
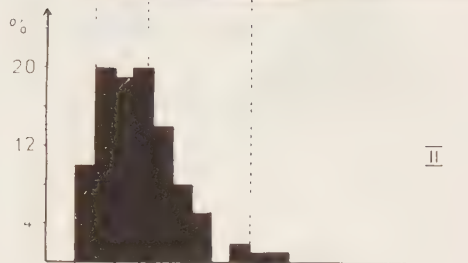
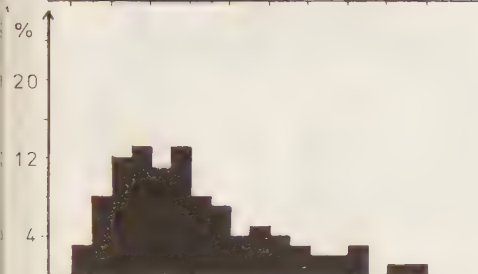
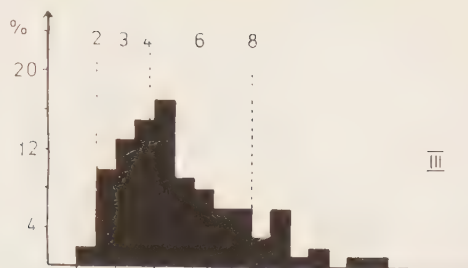
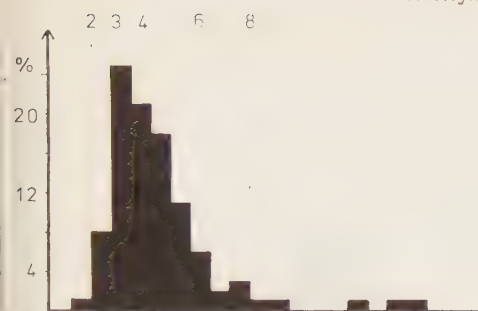
Substanz	Leberzell-Ca.	Hämangioendotheliom und Cysten	Leberzell-Ca. u. Hämangioend.	ohne Lebertumoren	Magen-Ca.	weitere Tumoren	Leukosen
K	-	-	-	-	-	-	10 %
A ₁	-	-	-	-	-	-	10 %
D	24 %	24 %	49 %	3 %	50 %	6 %	-
D _{A1}	28 %	17 %	55 %	-	46 %	10 %	-

Sterblichkeit DÄNA und DÄNA + A₁

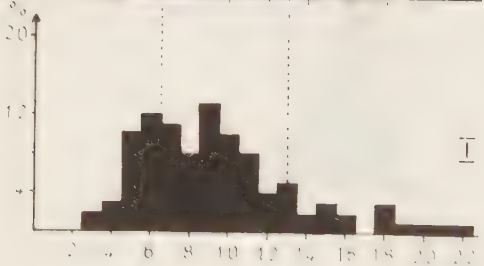
Wochen	Anzahl der Tiere in %	
	DÄNA	DÄNA+A ₁
16.-18.	6	9
18.-20.	0	0
20.-22.	0	0
22.-24.	0	5
24.-26.	10	5
26.-28.	5	5
28.-30.	5	10
30.-32.	7	14
32.-34.	10	5
34.-36.	7	0
36.-38.	9	14
38.-40.	2	5
40.-42.	5	0
42.-44.	15	9
44.-46.	9	0
46.-48.	4	5
48.-50.	4	0
50.-52.	0	9
52.-54.	2	0
54.-56.	0	5

Substanz	³ H-Index in %		Mitoseindex in %
	Parenchym	Extraparenchym	
K	0,03	0,2	0
A ₁	0,02	0,2	0,02
D I	0,5	0,7	0,09
D II	0,9	1,1	0,08
D III	1,2	1,4	0,06
Leberzell- Carcinom	6	3	0,9
DA ₁ I	0,5	0,7	0,06
DA ₁ II	0,7	0,6	0,18
DA ₁ III	1,2	1,4	0,04
Leberzell- Carcinom	4	3	0,6

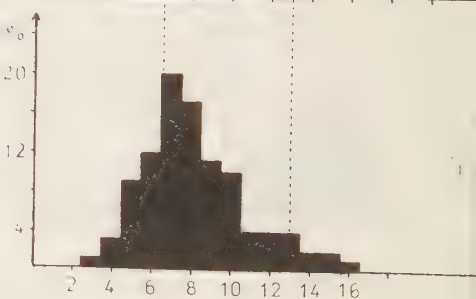
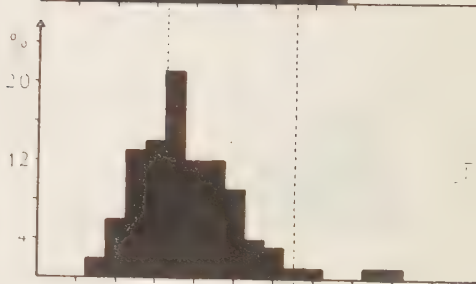
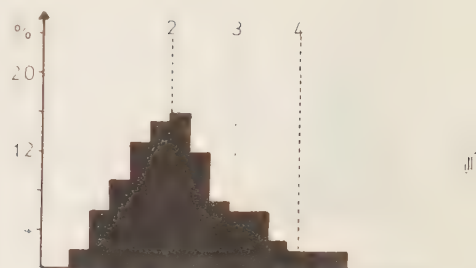
Parenchym



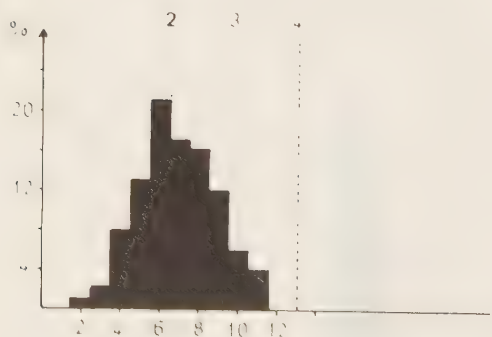
Extraparenchym



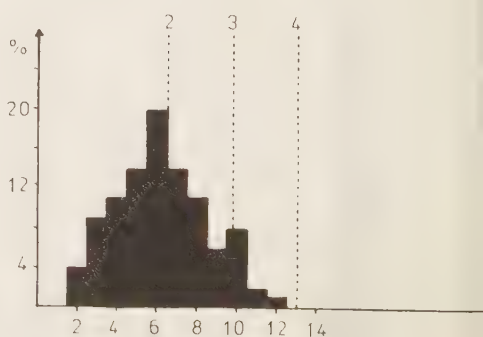
DANA



DANA + A₁

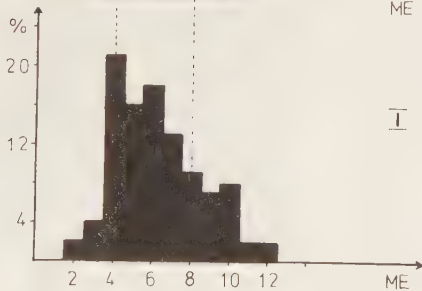
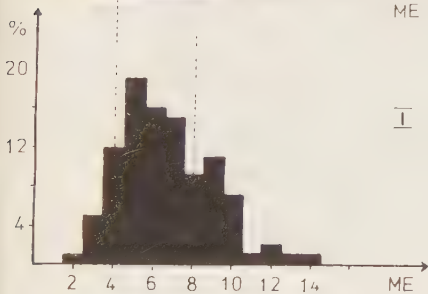
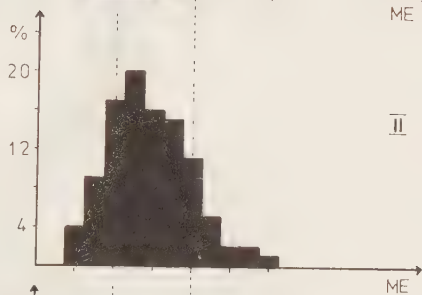
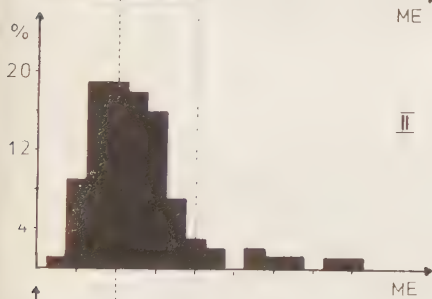
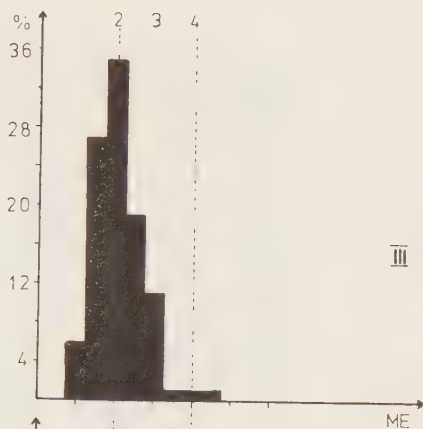
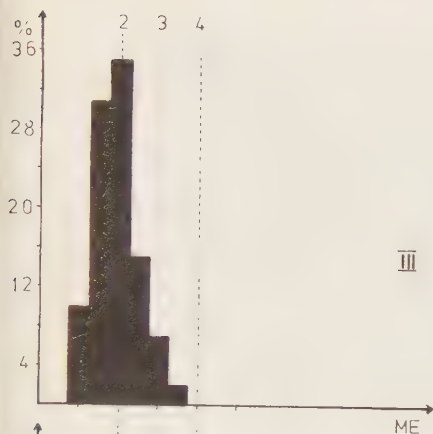


Kontrolle



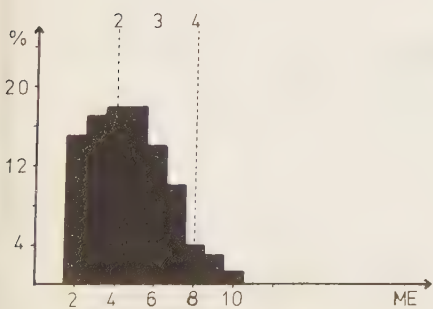
A₁

Haut

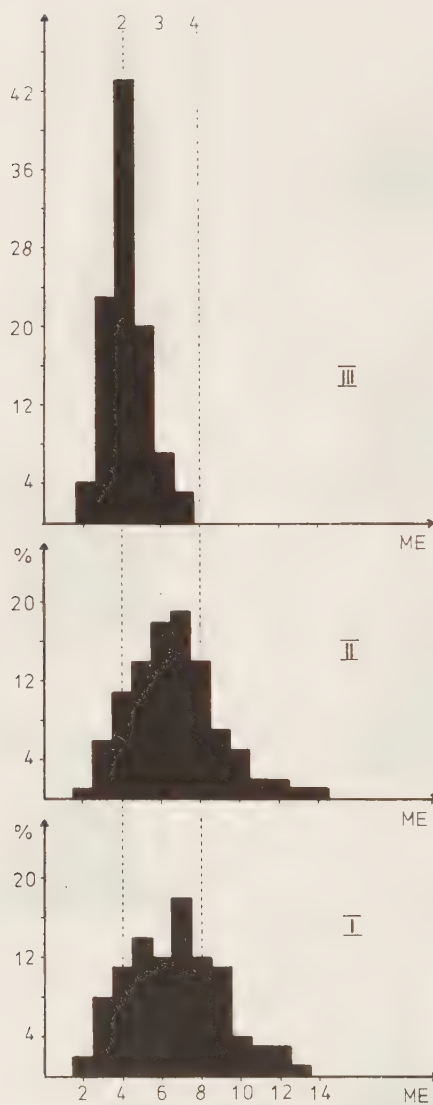


μ_1

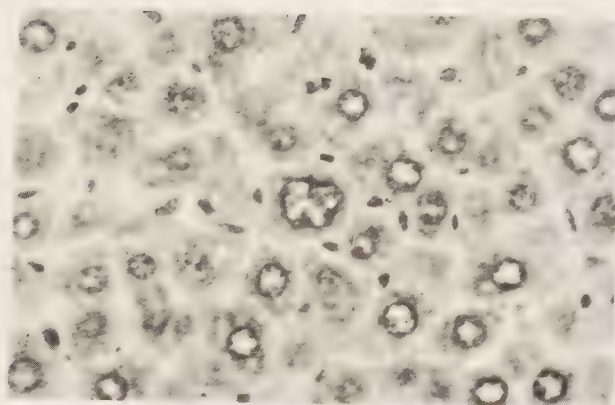
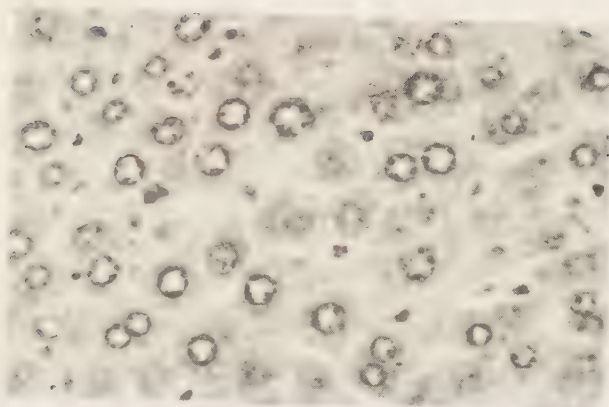
$DANA + A_1$



Haut



DANA



b

a) Leber, Kontrolle

b) Leber nach Behandlung mit dem Phorbol ester A₁

Vergrößerung 12,5 x 40

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

Während gemessen am Parameter Zellzahl pro Flächeneinheit des Leberparenchym bei Kontroll- und A_1 -Tieren mit zunehmender Versuchsdauer im Sinne des normalen Wachstums abnehmende Tendenz aufweist, nimmt die Zellzahl in den Präparaten der DANA- und DANA + A_1 -Gruppe nach anfänglichem Rückgang der Ein- und Doppelkernigen unter Substanzeinwirkung im Laufe des Versuches (26., 36 und 40. Woche) wieder zu. Demzufolge hat bis zum Zeitpunkt der 40. Woche keine Proliferation stattgefunden. Die Zellzahl des Extraparenchyms verändert sich nicht.

Während bei A_1 -Tieren ^3H -Index und Histogrammdarstellung den Kontrollen entsprechen, findet sich bei der Analyse der Gesamtzellzahl eine Abnahme der Doppelkernigen bei gleichzeitiger Vermehrung von Langkernen. Daraus muß geschlossen werden, daß eine perkutane Resorption von A_1 stattfindet, die in der Leber ein vermehrtes Auftreten von Kernfusionen auslöst, die im Markierungsmuster nicht in Erscheinung treten. Eine entsprechende Resorptionswirkung des A_1 -Lösungsmittels Aceton konnte durch eine besondere Versuchsreihe ausgeschlossen werden.

Gegenüber den Kontrollen haben die ^3H -Indices unter DANA-Einwirkung in der 40. Woche im Parenchym um das 40-fache, im Extraparenchym um das 7-fache zugenommen. Innerhalb der DANA-Versuchsreihe stieg der ^3H -Index zwischen der 26. und 40. Woche im Parenchym um das 2,4-fache, im Extraparenchym um das 2-fache an.

Die ^3H -Indices der DANA + A_1 -Kombination verhalten sich wie die der DANA-Gruppe.

Da sich die Zellzahl im Parenchym und im Extraparenchym in beiden Gruppen nicht wesentlich ändert, der ^3H -Index aber deutlich ansteigt, ist die DNS-Synthesesteigerung im Sinne einer

Polyploidisierung zu werten, was auch in den Histogrammen deutlich zur Darstellung kommt. Hier zeigt sich in der Leber unter der Einwirkung von DÄNA sowohl im Parenchym als auch im Extraparenchym eine im Laufe des Versuches wieder rückläufige Polyploidisierung. Diese allein bedeutet noch keinen Hinweis für eine Carcinomentstehung, wie andere Versuche mit Phenobarbital und Methoxyfluoran, die gleichfalls eine Polyploidisierung bewirkten, ergeben haben (SCHAUDE, 1972). Es fällt aber eine während des Versuches zunehmende Hyperploidie vor allem im hypertetraploiden Bereich auf, die im Tumorpräparat besonders deutlich wird. Da diese Veränderungen aber nur die Kerne des Organs betreffen, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt der Untersuchung in der Synthesephase befanden, ist über den hyperdiploiden Anteil des Gesamtspektrums, der wahrscheinlich durch direkte Teilung zustande kommt, keine Aussage möglich.

Da auch die heteroploiden Anteile in den Histogrammen vermehrt sind, muß daran gedacht werden, daß dieser Ploidiegrad für die hyperploide Umwandlung eine Rolle spielt.

Für die Kombination DÄNA + A₁ ergibt sich sowohl für das Parenchym als auch für das Extraparenchym grundsätzlich kein qualitativer Unterschied zur DÄNA-Gruppe; es ist jedoch bemerkenswert, daß im Verlauf der Polyploidisierung ein temporärer Unterschied insofern besteht, als sie zu einem Zeitpunkt noch nachweisbar ist, in dem sie bei DÄNA schon rückläufig ist. In den Autoradiogrammen des Extraparenchyms fällt auf, daß Gallengangs-wucherungen hier schon früher vermehrt auftreten, weshalb auch das in den Versuchsergebnissen beschriebene Phänomen der niedrigeren Werte früher in den Histogrammen zum Ausdruck kommt.

Im Unterschied zur Leber wurde in der Haut bei allen Versuchsgruppen, auch bei A_1 , gegenüber den Kontrollen eine Vermehrung der markierten Zellen beobachtet. Im Gegensatz zur Leber nimmt diese auch in den D $\bar{N}$ NA- und D $\bar{N}$ NA + A_1 -Präparaten im Laufe des Versuches wieder ab. Auch in den Histogrammen der Haut tritt bei allen drei Versuchsgruppen gegenüber der Kontrolle eine Polyploidisierung auf, die wie in der Leber rückläufig ist. Neben der Polyploidisierung ist auffallendstes Merkmal ein Gipfel der Häufigkeitsverteilung im Bereich hyperploider Kernklassen, wobei die Maximalwerte den hyperdiploiden Anteilen zufallen. Gleichfalls vermehrt, wenn auch geringer, sind triploide Kerne, während hexaploide so gut wie fehlen.

Im Gegensatz zur Leber ist diese Hyperdiploidie für alle Versuchsgruppen (A_1 , D $\bar{N}$ NA, D $\bar{N}$ NA + A_1) voll reversibel. Dies ist insofern verständlich, als bei der histologischen Untersuchung keine Carcinome gefunden wurden. Eine irreversible Aneuploidie wird erst mit zunehmender Malignität beobachtet (GCERTTLER, HAAG und TASCA, 1971). Da sich in unserem Versuch schon in der 36. Woche Lebermalignome nachweisen ließen, kann davon ausgegangen werden, daß diese in der Leber irreversible Hyperdiploidie von der in der Haut reversiblen Hyperdiploidie grundsätzlich verschieden ist.

In Einklang mit GCERTTLER, HAAG und TASCA, die in ihren Untersuchungen in der Leber wohl eine Beeinflussung der Kernvolumen-DNS-Korrelation für D $\bar{N}$ NA, nicht aber in der Haut für das Cocarcinogen A_1 fanden, muß daraus der Schluß gezogen werden, daß A_1 den Zellkernstoffwechsel nur reversibel veründert, "während echte Carcinogene eine irreversible Schädigung bewirken".

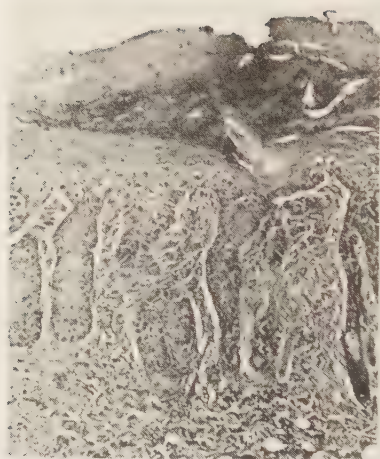
Inwieweit die Heteroploidie (Triploidie) für das maligne Wachstum oder die Entstehung der Hyperploidie von Bedeutung ist, läßt sich aus dieser Versuchsreihe nicht differenzieren. Weitere Aufschlüsse über solche Entstehungsmechanismen könnten Chromosomenanalysen ergeben.

Bei der histologischen Untersuchung der Spontan-toten fanden wir in der Leber Veränderungen, wie sie unter der Einwirkung von DENA bekannt sind (SCHMÄHL, THOMAS und KÖNIG, 1963; THOMAS und SCHMÄHL, 1963).

Auffallend war der hohe Prozentsatz an Leberzell-Carcinomen, deren Entstehung auf Grund der niedrigeren DENA-Dosierung zu erklären sein dürfte. Bei höherer DENA-Dosis erreichen die Tiere die Ausbildung der Carcinome nicht, da sie vorher an Verblutungen aus Cysten und Hämangioendotheliomen zugrunde gehen.

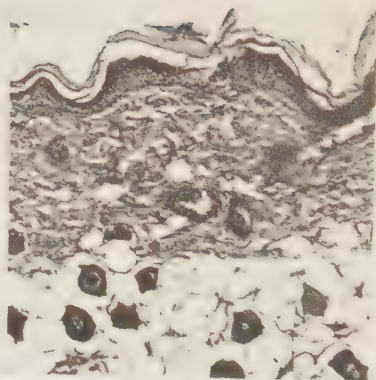
In der Haut konnten wir mit dem Wirkstoff A_1 eine noch in der 26. Woche bestehende Hyperplasie und Proliferation erzeugen, die sich in der 36. und 40. Woche als reversibel erwiesen. Nach der Behandlung mit A_1 entstand bei einem der 30 eingesetzten Tiere ein Papillom, das sich spontan zurückbildete. Ein weiteres hyperkeratotisches Papillom wurde an einem Tier der DENA + A_1 -Kombination beobachtet. Über die Rückbildungsfähigkeit dieses Papilloms läßt sich keine Aussage machen, da das Tier zur Sicherung des Befundes vorzeitig getötet wurde.

Auch für dieses unter der kombinierten Substanzeinwirkung entstandene Papillom ist eine Reversibilität als möglich anzunehmen, da Hyperplasie und Papillombildungen nach LAU, ROHRBACH und THOMAS (1972) als prä-maligne Veränderungen der Haut gewertet

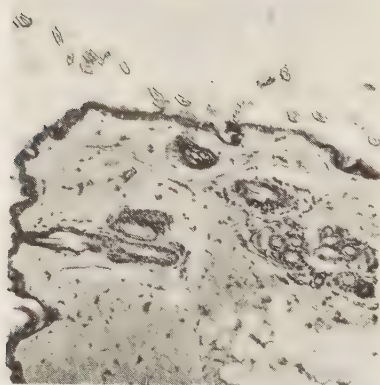


A₁

26. Woche

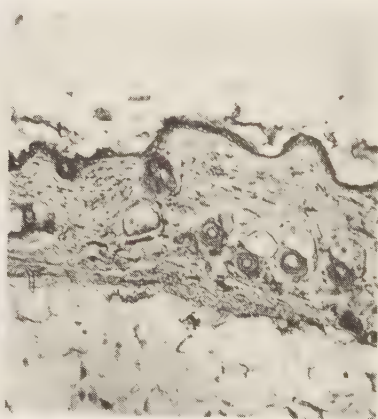


DANA + A₁



A₁

40. Woche



DANA + A₁

Reversible Hyperplasie der Haut nach Behandlung mit dem
Phorbol ester A₁ und DANA + A₁
Vergrößerung 12,5 x 3,5

werden und wir sowohl für die Hyperplasie als auch für ein Papillom die Rückbildungsfähigkeit beobachten konnten.

Die Frage, ob DMBA als Carcinogen in Kombination mit dem Cocarcinogen A_1 die Tumorbildung in der Haut aktiviert, muß für die angewandte Dosierung verneinend beantwortet werden. Das kann folgende Gründe haben:

1. Für DMBA wurde eine immer noch zu hohe Dosierung gewählt, so daß eine Tumoraktivierung in der Haut nicht erlebt wurde, da die Tiere vorher an Lebertumoren starben (BRUCKREY, BREUSCHANN, IVANKOVIC und SCHMÄHL 1967).
2. Die Dosis von A_1 reichte für eine Cocarcinogenese nicht aus. Dafür spricht, daß wir mit dieser Dosierung zwar eine Hyperplasie der Haut induzierten, die sich, wie auch von BACH und GUENTTLER (1971) beschrieben, als reversibel erwies, aber eine Tumorentstehung, wie sie von HECKER und Mitarbeitern (1965) nach einer Behandlung von 12 Wochen erlangt wurde, konnten wir nicht beobachten.
3. Auf Grund der organotropie des DMBA reicht die Initiatorwirkung der Substanz für eine Syncarcinogenese mit A_1 in der Haut nicht aus. Dafür sprechen Befunde von SCHMÄHL und THOMAS (1965), die feststellten, daß für eine Syncarcinogenese das Zusammenwirken von gleichgerichteten organotropen Substanzen notwendig ist, und Untersuchungen von HECKER (1965), der bei Anwendung verschiedener Initiatoren (Methylcholanthren, Dibenzanthracen, Benzpyren) eine geringere Tumorausbeute als bei DMBA (Dimethylbenzanthracen) nachweisen konnte.

Zusammenfassung

An 120 weiblichen Albinomäusen (Stamm NMRI des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht in Hannover) wurde im Vergleich mit 30 unbehandelten Kontrolltieren in einem Langzeitversuch über 2 Jahre untersucht, ob durch das vorwiegend hepatotrope Carcinogen DÄNA bei anschließender Behandlung mit dem dermatotropen und cocarcinogenen Wirkstoff des Crotonöls A₁ Tumoren in der Haut entstehen. Die Gesamtdosis des im Trinkwasser verabreichten DÄNA betrug ca. 480 mg/kg, die des in Aceton gelösten, lokal auf die Haut aufgetragenen Wirkstoffes A₁ 0,18 mg.

Für die Auswertung des Versuchsmaterials wurden

- 1) in Autoradiogrammen nach der 26., 36. und 40. Versuchswoche die Zelldichte und der ³H-Index in der Leber bestimmt und die mikroskopphotometrisch ermittelte Silberkorndichte pro Kern für Leber und Haut in Form von Histogrammen dargestellt und
- 2) histologische Schnittpräparate der Spontanoten herangezogen.

I. Leber

Bei Kontroll- und A₁-Tieren ergibt sich ein normales Wachstum, wobei aber im Parenchym unter A₁ eine Abnahme der doppelkernigen Zellen bei gehäuftem Auftreten von Langkernen als Ausdruck vermehrter Kernfusionen auffällt.

Unter der Einwirkung von DÄNA nimmt im Parenchym die Zahl der einkernigen Zellen zu, die der doppelkernigen ab, d.h., es kommt zur Polyploidisierung durch Kernfusionen. Die Zellzahl des Extraparenchyms verändert sich nicht.

Die ³H-Indices der DÄNA-Gruppen steigen im Verlauf des Versuches für Parenchym und Extraparenchym an und sind gegenüber den

Kontrollen immer erhöht. Die ^3H -Histogramme zeigen eine zunehmende Polyploidie und eine Polyploidisierung, die im späteren Verlauf rückläufig wird. Bei der Kombination D.M.A. + A_1 ist die Rückläufigkeit der Polyploidisierung verzögert.

Die mit D.M.A. behandelten Spontansteten wiesen Tumoren auf. In der Leber fiel gegenüber einem früheren D.M.A.-Versuch der hohe Prozentsatz an Leberzell-Carcinomen auf.

III. Haut

Die Histogramme der Versuchsgruppen A_1 , D.M.A. und D.M.A. + A_1 zeigen eine während des Versuches rückläufige Polyploidisierung und eine deutliche Hyperplasie.

Unter dieser Behandlung mit dem Wirkstoff A_1 wurde auch in Verbindung mit D.M.A. in der Haut eine reversible Hyperplasie beobachtet. In beiden Gruppen wurde je ein papillomatöser Hauttumor diagnostiziert. Unter D.M.A. allein nicht auf.

Bei der angewandten Dosierung und Versuchsanordnung konnte also in der Haut für D.M.A. in Kombination mit A_1 eine carcinogene Initiatorwirkung nicht festgestellt werden. Eine Promotion der D.M.A.-Carcinogenese durch das Cocarcinogen A_1 ist ebenfalls zu verneinen.

LITERATUR

- 1) BACH, H. und GOERTTLER, K.:
Morphologische Untersuchungen zur hyperplasiogenen Wirkung
eines biologisch aktiven Phorbolesters Ph_1
Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 8, 196-205 (1971)
- 2) BERENDELUN, I.:
The cocarcinogenic action of croton resin.
Cancer Res. 1, 44, 807 (1941)
- 3) DRUCKREY, H., SCHMÜHL, D. und SCHILDBACH, A.:
Dosiswirkungsbeziehungen bei carcinogenen Substanzen
Naturwissenschaften, 48, 56-57 (1961)
- 4) DRUCKREY, H. und STEINHOFF, D.:
Erzeugung von Leberkrebs am Meerschweinchen
Naturwissenschaften, 49, 497 (1962)
- 5) DRUCKREY, H., SCHILDBACH, A., SCHMÜHL, D. und PREUSSMANN, R.:
Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von
Diäthylnitrosamin
Arzneimittelforschung 13, 841 (1963)
- 6) DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., PREUSSMANN, R. und IVANKOVIC, S.:
Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von
Methyl-nitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen
an Ratten
Z. Krebsforschung, 66, 11-10 (1964)
- 7) DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S. und SCHMÜHL, D.:
Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen
N-Nitrosoverbindungen an ED-Ratten
Z. Krebsforschung 69, 103-201 (1967)

- 8) GERTTLER, K., HANG, D. und TASCA, C.:

Cytophotometrische Untersuchungen an Zellkernen von
experimentell erzeugten Neoplasmen

Z. Krebsforschung 76, 155-166 (1971)

- 9) HECKER, E.:

Über die Wirkstoffe des Crotonöls

I. Biologische Tests zur quantitativen Messung der entzündlichen, cocarcinogenen und toxischen Wirkung

Z. Krebsforschung 65, 325-333 (1963)

- 10) HECKER, E., BRESCH, H. und v. SZCZEPANSKI, Ch.:

Cocarcinogen A_1 - der erste, reine, hochaktive Wirkstoff aus Crotonöl

Angew. Chem. 76, 225 (1964)

- 11) HECKER, E. und BRESCH, H.:

Reindarstellung und Charakterisierung eines toxisch, entzündlich und cocarcinogen hochaktiven Wirkstoffes

Z. Naturforschung 20 b, 216-226 (1965)

- 12) HECKER, E., JARCYK, H., MEYER, J.G., BRESCH, H. und BRACHMANN, I.:

Über die Wirkstoffe des Crotonöls

II. Eine systematische Fraktionierung des Crotonöls

Z. Krebsforschung 66, 478-490 (1965)

- 13) HECKER, E., IMMICH, H., BRESCH, H. und SCHAIRER, H.U.:

Über die Wirkstoffe des Crotonöls

VI. Entzündungsteste am Mäuseohr

Z. Krebsforschung 68, 366-374 (1966)

14) HECKER, E.:

17. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie
in Moosbach, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York,
1966, S. 105-116

15) HECKER, E., v. SZCZEPANSKI, Ch., KUBINYI, H., BRESCH, H.,
HÄRLE, E., SCHAIRER, H.U. und BARTSCH, H.:

Über die Wirkstoffe des Crotonöls, VII. Phorbol
Z.Naturforschung 21 b, 1204-1214 (1966)

16) HECKER, E.

Phorbpl Esters from Croton Oil, Chemical Nature and
Biological Activities
Naturwissenschaften 54, 282-284 (1967)

17) HECKER, E. und SCHAIRER, H.U.:

Über die Wirkstoffe des Crotonöls, VIII. Verbessertes
Isolierungsverfahren für die Wirkstoffgruppen A und B sowie
Isolierung und Charakterisierung weiterer Wirkstoffe der
Gruppe A
Z. Krebsforschung 70, 1-12 (1967)

18) LAU, M., ROHRDACH, R. und THOMAS, C.:

Zur Morphologie der experimentell induzierten Hauttumoren
bei der Ratte und der haarlosen Maus
Beitr. Path. 146, 33-54 (1972)

19) MICHEL, R.: Med. Dissertation, Marburg (1968)

20) NOTTRAM, J.C.: J. Pathol. Bacteriol. 56, 181, 391 (1944)

21) OEHLERT, W., HÄMMERLING, W. und BÜCHNER, F.:

Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonuclein-
säure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach
Teilhepatektomie
Beiträge zur path. Anatomie 76, 91-112 (1961)

22) PERA, F.:

Mechanismen der Polyploidisierung und der somatischen
Reduktion in Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte
Band 43, Heft 5, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

23) PILGRIM, Ch., ERB, W. and MAURER, W.:

Diurnal Fluctuations in the Numbers of DNA Synthesizing
Nuclei in various Mouse Tissues
Nature No 4896 Aug. 31 1963

24) RUDERS, A.M.:

Techniques of Autoradiology Elsevier
Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1967)

25) SCHAUDE, G.: Med. Habilitationsschrift, Marburg 1972

26) SCHMIDL, D., PREUSCHNER, R. und HAMPERL, H.:

Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach
oralen Gabe bei Ratten
Naturwissenschaften 47, 89 (1960)

27) SCHMIDL, D., THOMAS, C. und KÖNIG, K.:

Versuche zur Krebserzeugung mit Diäthylnitrosamin bei Mäusen
Naturwissenschaften 50, 407 (1963)

28) SCHMIDL, D., THOMAS, C. und KÖNIG, K.:

Experimentelle Untersuchungen zu "Syncarcinogenese"
Versuche zur Krebserzeugung an Ratten bei gleichzeitiger
Applikation von Diäthylnitrosamin und 4-Dimethylaminoazobenzol
Z. Krebsforschung 65, 342 (1963)

29) SCHMIDL, D. und THOMAS, C.:

Dosiswirkungsbeziehungen bei der Erzeugung von Hämangioendo-
theliomen der Leber bei Mäusen durch Diäthylnitrosamin
Z. Krebsforschung 66, 533 (1965)

- 30) SCHMÄHL, D., THOMAS, C. SÄTTLER, W. und SCHELD, G.F.:

Experimentelle Untersuchungen zur Syncarcinogenese

Versuche zur Krebserzeugung bei Ratten bei gleichzeitiger
Gabe von Diäthylnitrosamin und Tetrachlorkohlenstoff bzw.
Äthylalkohol.

Z. Krebsforschung 66, 526 (1965)

- 31) SCHMÄHL, D. und THOMAS, C.:

Versuche zur Krebserzeugung an Ratten bei gleichzeitiger
oraler Gabe von DENA und 4-Dimethylaminostilben

Z. Krebsforschung 67, 135-140 (1965)

- 32) THOMAS, C. und SCHMÄHL, D.:

Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten
Lebertumoren bei der Maus und dem Meerschweinchen

Z. Krebsforschung 65, 531 (1963)

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. G. Schaudé
für ihre freundliche Anleitung bei dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. W. Schmid und Herrn Professor Dr. W. Kunz
danke ich herzlich für ihre Unterstützung bei der
Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 13. September 1940 wurde ich als Tochter des Regierungs-
direktors Karl van der Meulen und seiner Ehefrau Hildegard,
geb. Schnabel in Königsberg (Pr.) geboren.

Nach der Flucht aus Danzig besuchte ich von 1947 bis 1951
die Volksschule in Panker (Schleswig-Holstein), von 1951 bis
1960 die Gymnasien in Hilden, Koblenz und Hadamar, wo ich
1960 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommer 1960 begann ich in Innsbruck mit dem Studium der
Medizin, das ich in Marburg fortsetzte und hier 1966 mit dem
medizinischen Staatsexamen abschloß.

1971 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt.

Seit April 1972 arbeite ich als wissenschaftliche Angestellte
am Pharmakologischen Institut der Universität Marburg an der
Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

1963 habe ich den Diplomchemiker Dr. Friedrich Wilhelm Steuber
geheiratet. 1967 wurde mein Sohn Volker geboren.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

In Innsbruck: Gausser, Schadelbauer, Schröcksnadel,
Steinmaurer, Stöhr.

In Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Buchholz, Bücher,
Braun-Falco, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert,
Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hensel, Heuser,
Hildebrand, Hornung, Jakob, Lang, Linneweh, Löhr,
Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx,
du Mesnil de Rochemont, Neubauer, Niessing,
Petry, Rodeck, Rohen, Saalfeld, Sauer, Schleyer,
Schmid, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Seidel,
Siegert, Siess, Straub, Streicher, Vogt, Walcher,
Würtele.

